

Patrícia de Freitas Leucas Brito

**Síntese, caracterização e avaliação
in vivo e *in vitro* da biocompatibilidade de
nanocristais de TiO₂.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada.

**Uberlândia
2013**

Patrícia de Freitas Leucas Brito

**Síntese, caracterização e avaliação
in vivo e *in vitro* da biocompatibilidade de
nanocristais de TiO₂.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Co- orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Co- orientador: Prof. Dr. Noelio de Oliveira Dantas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof.^a Dra. Paula Dechichi

Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

Uberlândia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- B862s Brito, Patrícia de Freitas Leucas, 1971-
2013 Síntese, caracterização e avaliação *in vivo* e *in vitro* da biocompatibilidade de nanocristais de TiO₂ / Patrícia de Freitas Leucas Brito. -- 2013. 98 f. : il.
- Orientador: Adriano Mota Loyola.
Coorientador: Claudio Vieira da Silva.
Coorientador: Noelio de Oliveira Dantas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Biocompatibilidade - Teses. 3. Nanocristais - Teses. 4. Nanotecnologia. I. Loyola, Adriano Mota. II. Silva, Claudio Vieira da. III. Dantas, Noelio de Oliveira. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. V. Título.

CDU: 616.314

DEDICATÓRIA

A Deus por me conceder esta oportunidade e me sustentar até aqui.

*Aos meus filhos Rafael e Ana Carolina pela compreensão,
encorajamento e apoio.*

*A minha mãe Ivone, meu irmão Leonardo e minha cunhada
Cínara por todas as suas orações.*

*Aos meus amigos, em particular Lílían, irmãos em Cristo que me
ampararam através das suas intercessões.*

*Em especial ao meu esposo Jorge Luís pelo apoio incondicional,
paciência e carinho. A você toda minha gratidão e amor eterno.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Adriano Mota Loyola** por ter aceitado o desafio desta orientação apesar de minhas limitações e demonstrado paciência e compreensão. Pelo exemplo de ética, dedicação e competência. Muito mais que um orientador, realmente um mestre que me ensinou a aprender a aprender.

Ao **Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas** pelo maravilhoso trabalho e imensa dedicação à pesquisa, nos proporcionando o privilégio de experimentar sua sabedoria. Muito obrigada por tudo.

A **Doutoranda Anielle Christine Almeida Silva** pela imensa dedicação, pelo excelente trabalho de síntese e caracterização dos nanocristais de TiO_2 , sob a orientação do Prof. Dr. Noelio de Oliveira Dantas.

Ao **Instituto de Física (INFIS)** da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em particular ao **Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS)** sob a coordenação do Prof. Dr. Noelio de Oliveira Dantas que possibilitou esta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva** pela orientação nos experimentos *in vitro* de forma competente, demonstrando conhecimento, seriedade e, acima de tudo, sendo um amigo durante todo tempo.

Agradeço a **Bruna Cristina Borges** ex-aluna de IC, agora mestranda. Muito obrigada pela amizade, compreensão, dedicação e alegria.

Aos **alunos** e agora **amigos do LATRI (Laboratório de Tripanossomatídeos)** pelo indescritível apoio de todos (Adele, Aline, Amanda, Ana Flávia, Ana Clara, Cecílio, Célio, Fabiana, Fabrício, Lilian, Marlus, Núbia, Paula, Paulo César, Priscila, Rafael, Samuel, Tatiana, Thaise).

Aos meus amigos **Prof. Dr. Cássio José de Souza** e **Prof.^a Dra. Adriana Correa Lima** pela iniciativa de me encorajar a andar por este caminho e colaboração com a execução dos implantes subcutâneos deste trabalho.

A todos os professores e as secretárias Graça e Aline do Programa da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da UFU.

Em particular agradeço ao **Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso** pelo apoio e exemplo de ética e mestre . Ainda pela disponibilização do **Laboratório de Patologia Bucal** onde fui acolhida pelos amigos **João Paulo, Laís, Roberta, Luis, Prof.^a Dra. Carla Reis Machado Gomes, Adalci e Ângela.**

A todos meus **colegas de turma**, em particular à minha colega que se tornou **amiga Hany Angelis**, muito obrigada por todo apoio e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Tiago Mineo** pelo apoio e imensa ajuda na aquisição dos animais junto ao **CEBEA** e pela colaboração do **Laboratório de Imunoparasitologia** através de seus alunos e técnicos.

Agradeço a colaboração dos **bioteristas** do **CEBEA Thaise e Fabiano**, e aos **funcionários do CEBEA (Júnior, Marcelo, Luciana e Fátima).**

Também sou grata ao **Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti** pela imensa contribuição em microscopia eletrônica de transmissão.

Aos **Professores Dr. Marcelo José Barbosa, Dra. Paula Dechichi e Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki** pela disponibilidade e apoio ao participarem da banca da qualificação.

A **FAPEMIG** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e a **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

A todos vocês que direta ou indiretamente contribuíram para que este sonho fosse concretizado, minha sincera gratidão.

EPÍGRAFE

*"Retém a instrução e não a largues:
guarda-a, porque ela é a tua vida."*

Provérbios 4:13

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1 – INTRODUÇÃO	5
2 - REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1-Nanotecnologia	6
2.1.1- Histórico da Nanotecnologia	6
2.1.2- Nanomateriais	7
2.2- Nanocristais de dióxido de titânio	9
2.2.1 - Aplicações de nanocristais de dióxido de titânio	10
2.2.2- Evolução dos ensaios com TiO ₂	11
3- PROPOSIÇÃO	18
4 - MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1- Síntese e processamento de nanocristais de dióxido de titânio (TiO ₂)	19
4.2 - Caracterização de nanocristais de dióxido e titânio (TiO ₂)	20
4.3- Teste de biocompatibilidade por meio de implantes subcutâneos	21
4.4 - Processamento tecidual	24
4.5 - Análise histológica ao microscópio de luz	24
4.6 - Análise histológica ao microscópio eletrônico de transmissão	26
4.7- Obtenção da solução estoque de nanocristais de TiO ₂	26
4.8 - Obtenção de macrófagos peritoneais	27
4.9 - Cultura celular	27
4.10 -Teste de viabilidade celular- MTT	28
4.11- Dosagem de citocinas dos tecidos subcutâneos	30
4.12 - Dosagem de nitrito pela reação de Griess.	32
4.13 - Dosagem das citocinas a partir da cultura de macrófagos desafiados por nanocristais de TiO ₂	33
4.14 - Análise estatística	35

5- RESULTADOS	36
5.1- Propriedades estruturais dos nanocristais de TiO_2	36
5.2- Propriedades ópticas dos nanocristais de TiO_2	38
5.3- Implantes subcutâneos de nanocristais de TiO_2	39
5.3.1- Resposta tecidual subcutânea ao implante de nanocristais de TiO_2	39
5.3.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão	49
5.4 -Teste de Viabilidade Celular- MTT	51
5.5 - Dosagem de citocinas dos tecidos subcutâneos	51
5.6- Dosagem de nitrito pela reação de Griess.	54
5.7-Dosagem das citocinas a partir da cultura de macrófagos desafiados por nanocristais de TiO_2	55
6- DISCUSSÃO	58
6.1-Síntese e caracterização dos nanocristais de TiO_2	58
6.2- Biocompatibilidade avaliada pelo experimento <i>in vivo</i> de implantes subcutâneo de nanocristais de TiO_2	60
6.3- Avaliação da viabilidade celular	67
6.4- Produção de nitrito	70
6.5-Perfil inflamatório do experimento <i>in vivo</i>	73
6.6-Perfil inflamatório <i>in vitro</i>	73
7-CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
OBRAS CONSULTADAS	90
ANEXO	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
Å	angstrom
ADA	American Dental Association
AFM	Atomic Force Microscopy
AO	absorção óptica
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
Co	Cobalto
CO₂	dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DRX	difratometria de raios X
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drugs Administration
FDI	Federação Dentária Internacional
FL	Fluorescência
g	Grama
HNO₃	ácido nítrico
i.p.	Intraperitoneal
IBM	International Business Machines
IL	Interleucina
INF	Interferon
kg	Quilograma
M	Molar
m³	metro cúbico
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mm²	milímetro quadrado

mm³	milímetro cúbico
MTT	Metil Tiazolil Tetrazolim
NaNO₃	nitrato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NC_s	Nanocristais
Ni	Níquel
NO	óxido nítrico
NP	nanopartículas
nm	Nanômetro
°C	grau Celsius
OsO₄	tetróxido de ósmio
PA	Phosphate Buffered Saline
PBS	para análise
pH	potencial hidrogeniônico
PVC	policloreto de vinila
rpm	rotações por minuto
RSRAE	Real Sociedade e Real Academia de Engenharia
SFB	soro fetal bovino
SiO₂	dióxido de silício
STM	Scanning Tunnelling Microscope(microscópio de varredura por tunelamento)
TiO₂	dióxido de titânio
TNF	fator de necrose tumoral
Uf-TiO₂	partícula ultrafina dióxido de titânio
UV	Ultravioleta
UV/VIS	ultravioleta visível

RESUMO

Mediante a atual necessidade de pesquisas com nanocristais de TiO_2 ($\text{NC}_s \text{TiO}_2$) devidamente caracterizados a fim de se avaliar seus efeitos biológicos, realizou-se este trabalho que teve como objetivos a síntese e caracterização dos $\text{NC}_s \text{TiO}_2$, e a avaliação de sua biocompatibilidade. As nanopartículas foram sintetizadas pela técnica da precipitação via solução aquosa, e caracterizadas por meio das técnicas de difração de raios-X, micro-Raman e espectrofotometria. Para a avaliação da biocompatibilidade, os $\text{NC}_s \text{TiO}_2$ foram submetidos a testes *in vivo* por meio de implantes subcutâneos utilizando camundongos Balb/c na dose de 1g/kg, por 15, 30 e 90 dias para posterior análise histológica dos grupos de 15 e 90 dias e microscopia eletrônica de transmissão do grupo de 30 dias. Avaliação *in vitro* consistiu de ensaios de viabilidade celular, detecção e mensuração de metabólitos do óxido nítrico e mensuração da produção de citocinas *in loco* e em cultura de macrófagos desafiados por diferentes concentrações de $\text{NC}_s \text{TiO}_2$. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas pelo teste colorimétrico MTT, utilizando-se cinco concentrações diferentes de solução de 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ e 200 $\mu\text{g/ml}$, em desafio de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c por 2, 12, 24 e 72 horas. Do sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais avaliou-se a produção de nitrito pelo método de Griess e dosagem dos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12, INF- γ e IL-4 por ELISA. A mesma técnica foi utilizada para a dosagem dos níveis de citocinas obtida dos tecidos subcutâneo submetido ao implante de $\text{NC}_s \text{TiO}_2$. Após a análise da distribuição dos dados pelo teste Kolmogorov-Smirnov, procedeu-se a sua análise por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Bonferroni. Os experimentos de síntese e caracterização resultaram nanocristais de TiO_2 de 8,5nm em média, fase mista, alto grau de pureza e efeitos de confinamento quântico. As análises histológicas do grupo de 15 dias evidenciaram uma resposta inflamatória do tipo granulomatosa inespecífica intensa com sinais de necrose e hemorragia, que evoluiu com discreta redução em sua intensidade, constatada em especial aos 90 dias de observação. Presença de aglomerados de nanocristais de dimensões macroscópicas, rodeados de macrófagos e células gigantes multinucleadas formando granulomas, com cápsulas fibrosas, que poderiam ser consideradas como uma reação típica do tipo granulomatosa de corpo estranho e formação de fibrose mais intensa aos 90 dias no interior do material implantado. Houve a identificação dos nanocristais nos linfonodos nos diferentes períodos de estudo, sugerindo que estas partículas possam ser carregadas a distância. A microscopia eletrônica confirmou a evidência de apoptose e degeneração vacuolar. O teste MTT resultou em 40% de células viáveis somente em 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$. A dosagem de citocinas *in vitro* demonstrou que não houve uma tendência dose ou tempo dependente das amostras, apresentando comportamentos distintos de produção de TNF- α , IL-1 β , IL-12 e maior produção de INF- γ devido provavelmente à baixa produção de IL-4. A produção de nitrito foi maior nas amostras de 10 $\mu\text{g/ml}$. A produção de todas as citocinas do experimento *in vivo* pelo grupo de 15 dias foi acentuada, decrescendo de forma tempo dependente, colaborando com os achados *in vivo*. Conclui-se que os nanocristais de TiO_2 nas concentrações testadas apresentaram efeitos inflamatórios *in vivo*, citotóxicos e inflamatórios *in vitro*. Estes achados atestam que nas condições experimentais utilizadas os NC_s estudados não são biocompatíveis.

ABSTRACT

Upon the current need for research with TiO₂ nanocrystals (TiO₂ NC_s) properly characterized in order to evaluate their biological effects, this work was done aiming to synthesize and characterize TiO₂ NC_s, and evaluate their biocompatibility. The nanoparticles were synthesized by the precipitation in aqueous solution technique, and characterized by the techniques of X-ray diffraction, micro-Raman and spectrophotometry. To evaluate the biocompatibility, TiO₂ NC_s were tested *in vivo* using subcutaneous implants using Balb/c mice at a dose of 1g/kg for 15, 30 and 90 days for later histological analysis of the groups of 15 and 90 days and transmission electron microscopy of the group 30 days. *In vitro* evaluation consisted of cell viability assays, detection and measurement of nitric oxide metabolites and measurement of cytokine production *in situ* and in cultured macrophages challenged with different concentrations of TiO₂ NC_s. Cell viability was assessed after 72 hours by the MTT colorimetric assay, using five different concentrations of a solution of 10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 100µg/ml and 200µg/ml in culture challenge of peritoneal macrophages Balb/c mice with 2, 12, 24 and 72 hours. From the supernatant of cultures of peritoneal macrophages was evaluated the production of nitrite by the Griess method and dosage levels of TNF-α, IL-1β, IL-12, IFN-γ and IL-4 by ELISA. The same technique was used for the determination of cytokine levels obtained from subcutaneous tissues underwent implantation of TiO₂ NC_s. After analysis of the data distribution by Kolmogorov-Smirnov test, we proceeded to their analysis by the Kruskal-Wallis test with Bonferroni post-test. The experiments of synthesis and characterization resulted in TiO₂ nanocrystals of 8.5 nm on average, mixed phase, high purity level and quantum confinement effects. Histological analysis of the 15 days group showed a intense granulomatous nonspecific type inflammatory response with signs of necrosis and hemorrhage, which progressed with a slight reduction in its intensity, observed especially at 90 days of observation. Presence of clusters of nanocrystals with macroscopic dimensions, surrounded by macrophages and multinucleated giant cells forming granulomas with fibrous capsules, which could be regarded as a typical reaction of granulomatous foreign body type and more intense fibrosis formation at 90 days within the material deployed. Nanocrystals were identified in lymph nodes in the different periods of study, suggesting that these particles might be transposed. Electron microscopy confirmed the evidence of apoptosis and vacuolar degeneration. The MTT test resulted in 40% viable cells in only 10 and 20µg/ml. The *in vitro* cytokine assay showed that there was not a tendency dose or time-dependent samples, presenting different behavior of TNF-α, IL-1β, IL-12 and increased production of IFN-γ probably due to low production of IL-4. The nitrite production was higher in the samples of 10µg/ml. The production of all cytokines *in vivo* experiment by the 15 days group was enhanced, decreasing in a time-dependent fashion, collaborating with the findings *in vivo*. We conclude that the TiO₂ nanocrystals present in the tested concentrations presented inflammatory effects *in vivo*, cytotoxic and inflammatory conditions *in vitro*. These findings show that the experimental conditions studied NC_s are not biocompatible.

1 - INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é reconhecida como desenvolvimento e aplicação de materiais com estruturas de dimensões menores que 100nm. Os nanomateriais assumem novas características e funções devido à dimensão em nanoescala. Devido à exposição aos nanomateriais ser uma realidade cada vez mais difundida, faz-se necessário avaliar e compreender seus efeitos na saúde humana, bem como seus riscos, vias de entrada e mecanismos moleculares de citotoxicidade.

Dentre os diversos nanomateriais utilizados destacamos o dióxido de titânio (TiO_2), que é um mineral de ocorrência natural que pode se apresentar em três formas cristalinas conhecidas como rutila, anatase e brookite (Olmedo *et al.*, 2007). Esse mineral é utilizado em tintas, pigmentos, filtros solares, cosméticos, corantes da indústria alimentícia, pastas dentais e medicamentos. O dióxido de titânio em tamanho convencional ($>100\text{nm}$) é utilizado desde a década de 20, sendo considerado inerte e biocompatível, porém, em nanoescala ainda não se tem evidências concretas sobre suas consequências ao organismo.

A maioria das pesquisas biológicas realizadas empregam nanopartículas comerciais, fornecendo as características expressas pelo fabricante, com restritas informações de fase, dimensão e pureza. O número de estudos envolvendo nanopartículas de TiO_2 com o devido processo de caracterização ainda é pequeno. Este fato dificulta uma possível conclusão sobre seus reais efeitos, gerando a divergência de resultados contidos na literatura.

Este estudo foi idealizado mediante a necessidade de se desenvolver uma pesquisa com nanopartículas de TiO_2 com adequada caracterização tornando possível a apresentação de resultados efetivamente válidos quanto seus efeitos biológicos. Para que se alcançasse o propósito desejado, a pesquisa se fez em duas vertentes distintas que se convergiram em um único objetivo. Uma vertente teve como meta a síntese e caracterização das nanopartículas de TiO_2 , para definição precisa de suas dimensões, fase, grau de pureza e propriedades ópticas. A segunda vertente foi a submissão destas nanopartículas de TiO_2 a experimentos *in vivo* e *in vitro* analisando os resultados a fim de se buscar respostas sobre seus efeitos biológicos.

Espera-se com este trabalho colaborar para o embasamento de futuros experimentos sobre os possíveis efeitos biológicos de nanocristais de TiO_2 , permitindo a determinação de padrões de utilização seguros.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Nanotecnologia

O conceito de nanotecnologia foi proposto Royal Society e Royal Academia de Engenharia (RSRAE) em 2004: “Nanociência é o estudo dos fenômenos e manipulação de materiais atômicos, moleculares e escalas macromoleculares, onde as propriedades diferem significativamente daqueles em maior escala. As nanotecnologias incluem o design, produção, caracterização e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas de controle de forma e tamanho em escala nanométrica”.

Portanto, a nanotecnologia é reconhecida como desenvolvimento e aplicação de materiais com estruturas de dimensões menores que 100 nm.

2.1.1- Histórico da Nanotecnologia

O termo nanotecnologia foi cunhado pelo professor pesquisador Kerie E. Drexler, por volta de 1955. A palavra “nano” é derivada do grego e significa anão. Na palestra intitulada “There’s Plenty of Room at the Bottom” proferida na American Physical Society, por Richard Phillips Feynman em 29 de dezembro de 1959, foram apresentados os princípios da nanotecnologia, acompanhados do alerta para a necessidade de se obter novos conceitos físicos e estratégias de pesquisa. Ele afirmou que seria um conhecimento inevitável (Maynard, 2006).

No início da década de 1980 surgiram novos instrumentos que colaboraram com a nanomanipulação como o microscópio de varredura por tunelamento (STM) (1981) e o microscópio de força atômica (AFM) criado em 1986 pelos pesquisadores da IBM, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer. Estima-se que cinco milhões de trabalhadores e consumidores tenham contato com nanopartículas em um futuro próximo, seja voluntária ou involuntariamente. A

nanotecnologia tem sido reconhecida como um campo revolucionário da ciência e tecnologia, comparável à introdução da eletricidade, biotecnologia e as revolucionárias informações digitais. Houve um aumento em média de 25% da taxa anual entre 2001 e 2008 em relação ao número de descobertas, invenções e trabalhos em nanotecnologia (Rocco *et al.*, 2011).

2.1.2 - Nanomateriais

Nanomateriais são definidos como substâncias com pelo menos uma dimensão menor do que 100nm. A relação entre a superfície total de átomos ou moléculas aumenta exponencialmente com a diminuição do tamanho das partículas (Oberdörster, 2005). Desta forma, a nanotecnologia permite a compreensão, organização, manipulação e o controle da matéria em nível atômico, criando assim novas estruturas, dispositivos e sistemas que surgem com novas características e funções devido à dimensão em nanoescala (NSET, 2000).

A definição de nanomaterial está relacionada a materiais com a topografia entre 1 a 100 nm, porém em relação à forma se dividem em: 1) sólidos cristalinos, com o tamanho dos grãos variando de 1 a 100nm (nanocristais); 2) camadas superficiais únicas ou múltiplas, com espessura de 1 a 10nm (nanorrevestimentos); 3) pós extremamente finos com partículas variando de 1 a 100 nm (nanopós); 4) nanofibras, que são fibras com diâmetro de 1 a 100nm (Mendonça, 2008).

Os nanocristais são encontrados em inúmeras formas. Estima-se que 1.900 diferentes tipos de nanomateriais foram desenhados e fabricados, cada um dos quais com distintas características físico-químicas (Doak *et al.*, 2009). Um nanomaterial é feito intencionalmente, ao contrário de ser um subproduto acidental da combustão ou um processo natural, como a erosão, e muitas vezes, ele tem propriedades únicas ou associadas que surgem de seu pequeno tamanho. Também podem apresentar diversas formas (esférica, fibras, tubos), atividade de superfície (revestimentos), e capacidade de aglomeração.

Os investimentos globais estimados para nanotecnologia em 2009 foram da ordem de US\$ 251 bilhões. Esse valor deverá subir para US\$ 2,4 trilhões até 2015 (Bradley, 2010).

Vários são os nanomateriais que estão em uso no mercado, de setores de energia até a indústria farmacêutica. Na área da saúde estão presentes na engenharia de tecidos, diagnósticos ultrassensíveis e medicamentos.

Devido à exposição aos nanocristais (NC_s) ser uma realidade cada vez mais difundida, faz-se necessário avaliar e compreender seus efeitos na saúde humana, bem como seus riscos, vias de entrada e mecanismos moleculares de citotoxicidade (Medina *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012A). É importante a compreensão do comportamento de NC_s sob condições semelhantes àsquelas para estudos de nanotoxicidade *in vivo* e *in vitro* (Zhaoxiaj *et al.*, 2010; Palomäki *et al.*, 2010).

Após o primeiro relatório destacando a clara falta de informações sobre saúde humana e impactos ambientais da engenharia de nanomateriais, publicado em 2004 pela Royal Society e Royal Academy of Engineering, houve um aumento na atenção da saúde e segurança ambiental para nanomateriais. Vários outros relatórios governamentais surgiram neste tempo, mas considerações sobre a segurança dos nanomateriais certamente não cresceram em paralelo com o desenvolvimento da nanotecnologia, especialmente no seu braço industrial.

Cada nanomaterial deve ser tratado individualmente quanto aos riscos esperados à saúde. Os testes atualmente utilizados para verificar a segurança dos materiais devem ser capazes de identificar NC_s potencialmente danosos (Hoet *et al.*, 2004; Oberdörster *et al.*, 2005).

Desde 2006, pesquisadores como Maynard idealizavam o desenvolvimento, padronização e validação de métodos para avaliação da toxicidade de nanomateriais. Ele julgava ser um desafio a ser enfrentado dentro dos próximos 5 -15 anos. Defendia alguns aspectos que considerava cruciais para se estimular as pesquisas de alta qualidade e se evitar o uso desnecessário de resíduos perigosos de nanomateriais, chamando atenção

para a necessidade da validação de testes e o desenvolvimento de alternativas viáveis para testes *in vivo* com NC_s.

Em 2008, em um workshop em Washington dedicado à caracterização de materiais em estudos de nanotecnologia, foi orientado que os dados de nanotoxicidade das partículas deveriam ser acompanhados pelas características dos nanomateriais tais como a forma da partícula, o tamanho, taxa de dissolução, o estado de aglomeração e área de superfície. Tais características podem influenciar muito a reatividade biológica e são essenciais para a interpretação adequada dos resultados (Warheit, 2008; Valant *et al.*, 2012).

Surgiu, então, um constante fluxo de publicações demonstrando que existem fundamentos tais preocupações, com o fato de que muitos nanomateriais induzem citotoxicidade, stress oxidativo e inflamação, apesar de muitas incertezas e conflitos na literatura (Doak *et al.*, 2008).

Pesquisas realizadas no campo da nanotoxicologia não apenas auxiliarão o fornecimento de dados seguros para a engenharia de nanoestruturas e dispositivos, mas também no avanço do campo da nanomedicina, concedendo informações sobre suas propriedades desejáveis e indesejáveis, bem como meios para modulá-las segundo o interesse de seu emprego (Oberdörster *et al.*, 2005).

2.2 - Nanocristais de dióxido de titânio

O titânio está entre os dez mais frequentes elementos químicos que estão na camada terrestre. É um metal altamente reativo que desenvolve uma camada de dióxido de titânio (TiO₂) em sua superfície quando em contato com oxigênio. O TiO₂ é um mineral de ocorrência natural que pode se apresentar em três formas cristalinas conhecidas como rutila, anatase e brookite (Olmedo *et al.*, 2007). Rutila é a forma mais comum de TiO₂ encontrada na natureza. Dependendo do arranjo de suas fases as nanopartículas de TiO₂ podem assumir uma distribuição de fases organizada periodicamente a longo alcance configurando assim um cristal, então denominados nanocristais (NC_s). Por

outro lado, podem assumir uma distribuição de fases desorganizada, onde não se tem a apresentação de suas fases de forma periódica a longo alcance, sendo assim recebem a denominação de amorfo, ou simplesmente nanopartículas (NP_s). O TiO₂ é insolúvel em água, ácido clorídrico, ácido nítrico e etanol, mas é solúvel em ácido sulfúrico concentrado aquecido, fluoreto de hidrogênio e um álcali (EPA, 2010).

2.2.1 - Aplicações de nanocristais de dióxido de titânio

Também conhecido como "Titânio", o TiO₂ foi usado comercialmente por volta dos anos 20, em inúmeras aplicações industriais e de consumo, e principalmente em revestimentos e pigmentos como substituto de pigmentos à base de chumbo. Os NC_s TiO₂ têm sido utilizados para aumentar a brancura ou a opacidade de muitos produtos de consumo, tais como tintas, revestimentos, plásticos, papel, tintas de impressão, grânulos de revestimento, medicamentos, dentífricos, cosméticos e produtos para cuidados da pele. Está entre os cinco nanomateriais mais utilizados em produtos de consumo sob variadas formas (Shy *et al.*, 2013).

No ano de 1966 o TiO₂ foi incorporado à lista da FDA (Food and Drugs Administration) como um aditivo corante alimentar (E171) aplicado em laticínios, doces e coberturas, sendo também utilizado para aprimorar o sabor de certos alimentos como vegetais secos, nozes, sementes, sopas, mostarda, cerveja e vinho. Devido a sua transparência quando em escala nanométrica, tem sido aplicado em vários alimentos para retirar a humidade e oxigênio. NC_s de TiO₂ têm sido produzidos em grande escala industrial e usados amplamente por sua alta estabilidade física, suas propriedades anticorrosivas e fotocatalíticas (Xia *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010). NC_s de TiO₂ de 25nm são adicionados a filtros solares para obter máxima proteção UV, sendo responsável pelo melhoramento da apresentação dos filtros solares por não deixar resíduo branco na pele (Dechsakulthorn *et al.*, 2008; EPA, 2010). Esses NC_s são considerados biomateriais, visto que apresentam resposta tecidual apropriada quando de uma aplicação específica.

2.2.2- Evolução dos ensaios com TiO₂

Estudos toxicológicos direcionados ao TiO₂ iniciaram-se a partir do trabalho de Ferin e Oberdörster, por volta de 1990, sendo os primeiros a demonstrar inflamação pulmonar, onde houve a retenção e a translocação de NC_s de forma mais expressiva do que com partículas maiores. Os autores perceberam que a toxicidade dependia da forma e tamanho dos nanocristais.

Partículas em nanoescala podem certamente ser introduzidas no corpo humano através dos pulmões e dos intestinos. A penetração através da pele é menos evidente, apesar que é possível que algumas partículas possam penetrar profundamente na derme. Em 2004, Sayes *et al.*, afirmaram que TiO₂ em tamanho convencional é geralmente inerte. Ressaltaram, no entanto, que NC_s de TiO₂ sob iluminação (UV) são agentes oxidantes fortes, devido sua característica de fotocatalisador, capazes de reagir com uma grande variedade de moléculas orgânicas e biológicas. A fase anatase em tamanhos menores que 100nm têm um alto índice de refração, baixa dispersão e forte absorção da radiação ultravioleta (UV).

Testes *in vitro* são comumente utilizados devido a vários fatores como: existência de metodologias bem estabelecidas, baixo custo, necessidade de reduzido número de animais de laboratório, facilidade de interpretação, e a possibilidade de se utilizar maior número de replicatas. Por outro lado, a extrapolação dos resultados para os sistemas biológicos *in vivo* deve ser considerada com cautela em função da menor complexidade ambiental do sistema (Patri *et al.*, 2009).

Estudos sobre a exposição ao TiO₂ pela via pulmonar foram os pioneiros, despertando particular interesse por terem sido considerados como controle negativo (considerado inofensivo) para as demais partículas e em relação à exposição ocupacional (Sayes *et al.*, 2006; Jonhston *et al.*, 2009).

Oberdörster *et al.*(1992) demonstraram que as dimensões físicas de partículas de TiO₂ desempenham um papel importante na determinação da toxicidade. Além disso, partículas ultrafinas (Uf-TiO₂), que são consideradas as partículas abaixo de 50nm, foram capazes de entrar nos espaços intersticiais

do pulmão. O aumento da superfície de área das partículas seria a causa provável para a interação das partículas com os macrófagos alveolares o que levaria a uma reação inflamatória mais expressiva.

Avaliando o tipo de fase do nanocristal através de análises por microscopia eletrônica, Ryabchikova *et al.* (2010) demonstraram que um único NC de TiO_2 , de 4 a 5nm, contata diretamente com a membrana plasmática celular e que a modificação cristalina do NC (anatase, rutila, brookite) determina a natureza do contato. Este contato representa a etapa preliminar e geral que define a resposta subsequente da célula. Essa interação indica que, em nanoescala, compostos não orgânicos são capazes de influenciar diretamente as funções celulares. Desta forma esta foi a primeira evidência direta para sugestões anteriores de que o tamanho muito pequeno de NC_s resulta em contato muito íntimo com as células e, assim, pode gerar novos tipos de interações entre células e partículas com prováveis consequências na sua citotoxicidade.

As duas principais vias de absorção de NC_s pelas células são captação ativa por endocitose e absorção passiva por livre difusão. Fagocitose é um mecanismo de endocitose actina-dependente, típico de fagócitos "profissionais" como os macrófagos (Skocaj *et al.*, 2011).

Em 1998, Afaq *et al.* concluíram que se anteriormente o TiO_2 foi considerado biologicamente inerte, testes biológicos demonstraram que a exposição à Uf- TiO_2 provocou danos, inflamação pulmonar, fibrose pulmonar e tumores. Injetando Uf- TiO_2 de dimensão menor que 30nm por via intratraqueal, em uma dose de 2mg/rato, os pesquisadores observaram um aumento significativo na porcentagem de macrófagos alveolares no lavado pulmonar, que alcançou seu valor máximo no oitavo dia de exposição. A resposta inflamatória do pulmão em relação às partículas foi interpretada como tendo a finalidade de remover as partículas do tecido.

Resultados semelhantes foram obtidos em experimento similar por Chen *et al.* (2008) injetando em camundongos, por via intratraqueal, 50 μl de solução de NC_s de TiO_2 (21nm). Mesmo em volumes menores (0,1mg e 0,5mg

por animal), as NC_s provocaram aumento significativo no infiltrado de macrófagos alveolares.

Comparando Uf-TiO₂ de 29nm e carbono *black* de 14.3nm, Renwick *et al.*(2001) perceberam que mesmo em baixas concentrações (0,39 a 0,78 µg/mm²) as partículas ultrafinas reduziram a capacidade fagocítica de macrófagos J744. 2, sendo o efeito dependente do tipo específico da partícula.

Stearns *et al.* (2001) observaram por meio de microscopia de varredura, que células A549 (carcinoma pulmonar humano) apresentaram maior facilidade de internalizar aglomerados de Uf-TiO₂ de 50nm, sendo raros vacúolos com pequenos números (2 ou 3) de partículas. Para os autores partículas individuais não são alvos de fagocitose.

Na mesma linha de investigação, Geiser *et al.* (2008) submeteram ratos a inalação NC_s de TiO₂ (0, 1mg/m³) por uma hora e logo após através de broncolavagem recrutaram macrófagos alveolares e avaliaram a internalização das partículas após 1 h e 24h da exposição. Partículas maiores que 3 a 6µm foram mais efetivamente removidas pelos macrófagos alveolares comparativamente às menores que 20nm. A capacidade dos NC_s de escaparem da fagocitose foi confirmada por estarem cercados de partículas maiores e não estarem incluídos por membrana vesicular.

Além do fator dimensional das partículas, outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento de reatividade celular frente à NC_s. Neste sentido, Grassam *et al.* (2007) observaram um fato inesperado ao testar NC_s de 5nm (anatase) a 21nm (rutila) em camundongos por via inalatória. Os animais foram submetidos à inalação de volumes de 0,7mg/m³ e 7mg/m³ de NC_s de TiO₂ e à instilação nasal de 12,7µg/camundongo por 4 h. Após 24 horas observou-se elevado número de macrófagos pela inalação e instilação nasal, acompanhado de grande quantidade de neutrófilos. A resposta foi maior para os NC_s de 21nm do que para os de 5nm. Os autores consideraram que fatores como a fase (anatase e rutila), a superfície da área das NC_s e a cristalinidade devem ter sido importantes nas respostas diferenciadas observadas no experimento. A mesma observação foi feita por Zhang *et al.*(2012 B), que ao colocarem macrófagos Ana-I e células tumorais MH-S em contato com

diferentes tamanhos de NC_s de TiO₂, de fases diferentes (anatase e rutila), perceberam maior toxicidade para a fase anatase comparativamente a fase rutila. Para as células tumorais (MH-S) os efeitos citotóxicos foram muito mais expressivos quando comparados aos observados para os macrófagos.

Pesquisas *in vitro* alterando o tempo de exposição, concentração e cristalinidade dos NC_s, bem como os tipos celulares testados têm sido desenvolvidas. Vários esforços na tentativa de se descobrir a causa da toxicidade dos NC_s têm sido direcionados para conhecer se os ensaios de toxicidade das substâncias em macroescala podem ser apropriados também para caracterização de riscos na análise das NC_s, tendo em vista a possibilidade das propriedades de reatividade celular serem nanoespecíficas (Kroll *et al.*, 2009).

Vários resultados divergentes têm sido observados e atribuídos à ausência de padronização de testes *in vitro* e *in vivo* para nanomateriais. Enquanto não há consenso na literatura quanto à padronização específica para os testes biológicos, diversas metodologias têm sido propostas para estas avaliações (Johnston *et al.*, 2009; Krug & Wick, 2011; Valant *et al.*, 2012).

Bermudez *et al.* (2004) investigaram se a escolha das espécies foi capaz de influenciar a resposta pulmonar a nanocristais de TiO₂ com dimensão de 21nm. O trabalho expôs ratos, camundongos e hamsters a NC_s de TiO₂ por via inalatória durante 13 semanas (6 horas por dia, 5 dias por semana) nas concentrações de 0,5, 2 ou 10mg/m³. A resposta pulmonar foi aguardada por 52 semanas. Após a exposição, os autores avaliaram por meio de análise histopatológica a presença de inflamação e citotoxicidade dos NC_s. A natureza da resposta foi variada dentro das diferentes espécies. Foi demonstrado que camundongos e ratos foram susceptíveis ao desafio traduzido pela presença de inflamação tecidual, enquanto nenhuma alteração foi observada em hamsters.

Sohaebuddin *et al.* (2010) ressaltaram que além da composição e tamanho dos nanomateriais, o tipo de célula-alvo no desafio é um determinante crítico de respostas intracelulares, podendo responder pelo grau de citotoxicidade e o potencial mecanismo de toxicidade provocada pelos NC_s. Os

autores avaliaram três linhagens celulares, a saber: células 3T3 (fibroblastos) e RAW 264.7 (macrófagos) e células epiteliais bronquiolares imortalizadas para desafios com NC_s de TiO₂ de fase anatase, de dimensão de 5 a 10nm em várias concentrações (10, 100 e 1000µg/ml). Os resultados mostraram que um mesmo material pode induzir toxicidade por mecanismos variados, estando estes na dependência do tipo celular testado.

Chen *et al.* (2008) desafiaram camundongos com NC_s de TiO₂ de dimensões variando de 80 a 100nm, pelo método de injeção peritoneal em doses variadas (0, 324, 648, 972, 1296, 1944 e 2592mg/kg de peso) por 24h, 48h, 7 e 14 dias. Os animais foram divididos em 3 grupos: 1) controle, 2) tratamento com baixas doses de NC_s de TiO₂ e 3) tratamento com altas doses de NC_s de TiO₂. Logo após a exposição aos NC_s de TiO₂ os animais tratados apresentaram sinais de toxicidade aguda, traduzidos por sintomas apresentados em pele, membranas oculares e respiratórias, sistema nervoso central e autônomo, bem como padrões de comportamento. Após dois dias do tratamento, todos os animais apresentaram sinais óbvios de comportamento passivo, traduzido pela perda de apetite, tremor e letargia comparativamente ao grupo controle. Enquanto estes sinais nos animais que receberam baixas doses de TiO₂ foram diminuindo gradativamente até desaparecerem, os sinais para os ratos que receberam altas doses de TiO₂ foram progredindo para sinais de anorexia, diarreia, perda de peso corporal e perda de brilho nos pelos. Fragmentos teciduais de baço, coração, pulmão, rim, cérebro, fígado e do sistema cardiovascular foram analisados quanto à presença de NC_s de TiO₂ por meio de análise histopatológica. Rim, fígado, pulmão e baço apresentaram acúmulo de NC_s, sendo este último o órgão que mostrou maior concentração de depósitos. A natureza flogogênica das NC_s de TiO₂ foi observada em vários órgãos-alvo, não sendo possível identificar um órgão cuja resposta foi mais específica ou intensa. A inflamação tem sido um fenômeno recorrentemente observado, sem que se identifique um órgão ou sistema mais susceptível ao desafio (Li *et al.*, 2010).

Ainda que por via de administração diferente, resultados semelhantes foram encontrados por Fabian *et al.* (2008), injetando em ratos

Wistar por via caudal solução de NC_s de 20 a 30nm em uma concentração de 5mg/kg. Após 1, 14 e 28 dias do desafio, os animais foram sacrificados e seus órgãos preparados para análise histológica. Amostras de sangue também foram coletadas para dosagem de citocinas. O baço foi o órgão onde se notou a maior concentração de NC_s, que foi reduzindo com o passar do tempo. Porém o fígado foi o órgão em que o material permaneceu depositado por mais tempo em altas concentrações. Por outro lado, não foi possível observar qualquer tendência de mudanças nas enzimas que refletem a resposta inflamatória.

Gatti *et al.*(2008) implantaram no tecido subcutâneo dorsal e músculo paravertebral de ratos diversos materiais como TiO₂, SiO₂, Ni, Co e PVC (policloreto de vinila) na forma de disco e também injetaram estes materiais em forma de solução de NC_s com tamanhos variando de 20 a 160 nm, na dose média de 0,023ml/rato. Objetivando observar os efeitos de NC_s de TiO₂ comparativamente àqueles de dimensão convencional, fragmentos teciduais para análises foram avaliados após seis e doze meses do desafio. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostraram que os implantes de disco não foram letais, induzindo apenas inflamação local. Em relação aos implantes das soluções de NC_s, através de análises por ESEM foi observado a formação de aglomerados em microescala em que ao redor havia uma suave resposta inflamatória. Em relação a este fato Johnston *et al.* (2009) afirmam que como as partículas menores têm uma área de superfície maior do que os seus homólogos maiores, conseqüentemente exibem maior toxicidade, quando administradas numa dose de massa igual.

Almeida (2011), após síntese e caracterização de nanocristais de TiO₂ com tamanho médio de 21nm, fase mista anatase e rutila, avaliou por microscopia óptica a resposta inflamatória através de implantes intra-ósseos em cobaias (*Cavia porcellus*) por um período de quatro e doze semanas. Cada animal recebeu dois implantes inseridos em cada lado da linha mediana (sinfisária) da mandíbula. Foram verificadas respostas ausentes ou suaves em ambos os períodos. A resposta tecidual foi traduzida pela baixa variabilidade

celular e intensidade da resposta inflamatória, acompanhada pela presença de remodelação óssea na área lesada, e pela deposição de neoformação óssea diretamente em contato com o material. Neste caso, a deposição óssea tendia a respeitar a forma do depósito de material no tecido. No mesmo estudo, pode-se constatar por análise da nanotopografia por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês Atomic Force Microscopy), evidências da integração entre o osso neoformado e o material implantado, realçando a biocompatibilidade de um material aloplástico em escala nanométrica.

Em resumo, vários autores concluíram que numerosos parâmetros físico-químicos são considerados determinantes críticos da toxicidade dos nanomateriais: tamanho, estrutura cristalina, composição química, área da superfície. Mas nenhum parâmetro, isolado tem sido identificado como o principal responsável pela toxicidade do material (Jonsthorpe *et al.*, 2009; Pujalté *et al.* (2011); Chang *et al.*, 2013; Shy *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* (2012A) e Chang (2013) ressaltaram a necessidade do desenvolvimento de estudos epidemiológicos em relação aos diferentes possíveis tipos de exposição aos nanomateriais (do trabalhador, do consumidor e do ambiente) para mapear apropriadamente os problemas de saúde decorrentes da exposição aos NCs. Essas abordagens poderiam contribuir para o desenvolvimento de modelos mais adequados de predição das propriedades toxicológicas dos materiais e adequação de sua aplicação segura.

Há uma clara necessidade de novas teorias na complexidade da nanoescala, ferramentas para medições diretas, simulações de princípios básicos e integração de sistemas em nanoescala que poderiam acelerar as descobertas (Rocco *et al.*, 2011).

O número de estudos envolvendo nanocristais com caracterizações ainda é pequeno. É necessário haver uma exata caracterização físico-química, bem como informações sobre a dispersão e comportamento de cada tipo de partícula, visto as especificidades de suas propriedades físico-químicas (Horie *et al.*, 2012). É importante ressaltar a necessidade de se estudar detalhadamente o comportamento farmacocinético dos diferentes tipos de NCs determinando os riscos para a saúde associados a estes compostos.

3- PROPOSIÇÃO

Geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar a biocompatibilidade de nanocristais de TiO₂.

Específicas

- Sintetizar e caracterizar nanocristais de TiO₂;
- Avaliar morfologicamente a resposta tecidual a implantes subcutâneos de nanocristais de TiO₂;
- Avaliar a produção de citocinas teciduais produzidas no ambiente do implante subcutâneo de nanocristais de TiO₂;
- Avaliar a viabilidade celular em cultura de macrófagos submetida à exposição de nanocristais de TiO₂;
- Avaliar a produção de metabólitos do óxido nítrico em cultura de macrófagos submetidos à exposição de nanocristais de TiO₂;
- Avaliar a produção de citocinas produzidas por macrófagos em cultura submetidos à exposição de nanocristais de TiO₂.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os processos de síntese e caracterização das nanopartículas de TiO_2 foram desenvolvidos pelo Instituto de Física (INFIS) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) pela doutoranda Anielle Christine Almeida Silva sob orientação do Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas.

4.1- Síntese e processamento de nanocristais de dióxido de titânio (TiO_2)

Nanocristais de TiO_2 foram sintetizados pelo método de precipitação via solução aquosa (água ultrapura) (Dantas *et al.*, 2008). Inicialmente, preparou-se, à temperatura ambiente, uma solução contendo 300ml de água ultrapura e 30ml de ácido nítrico (HNO_3 70%) (Sigma Aldrich, St. Quentin, Fallavier, France), sob agitação magnética por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 60ml de isopropóxido de titânio ($\text{Ti} \{ \text{OCH} (\text{CH}_3)_2 \}_4$) 97% (Sigma-Aldrich), resultando, instantaneamente, numa solução branca leitosa (Figura 1a). O pH desta solução foi ajustado para 5.6, utilizando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 98% 4M (Sigma-Aldrich) e acrescentando 400ml de água ultrapura, em contínua agitação magnética por 30 minutos. A solução resultante foi mantida em repouso até que os nanocristais de TiO_2 se precipitassem (Figura 1b).

O precipitado foi monodisperso em 1000ml de água ultrapura, sob agitação magnética, e centrifugado a 6000rpm por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por várias vezes até a solução atingir pH 7,0. Finalmente, o precipitado resultante dessa solução purificada (pH 7,0) foi submetido aos seguintes tratamentos térmicos sucessivos em atmosfera ambiente utilizando uma estufa: (i) 60°C por 24 horas e 100°C por 12 horas, para eliminar água; (ii) 500°C por 1 hora, para favorecer a formação de nanocristais de TiO_2 nas fases anatase e rutila (Figura 1c).



Figura 1 – Fases após a síntese de nanocristais de TiO_2 : (a) solução obtida após a síntese; (b) solução em repouso (precipitada); (c) nanocristais em pó, obtidos após ciclos de aquecimento contínuos até 500°C .

4.2 - Caracterização de nanocristais de dióxido e titânio (TiO_2)

As caracterizações foram feitas por micro-Raman e Difração de Raios-X. O espectro de micro-Raman foi obtido utilizando o espectrofotômetro USB-4000 UV/VIS (ultravioleta visível) Miniature Fiber Optic Spectrofotometer (Ocean Optics, Dunedin, Flórida, EUA) como fonte de excitação a linha 785nm (Dantas *et al.*, 2008). O difratograma de raios-X (DRX) foi registrado por um DRX-6000 (Shimadzu-Nakagyo-ku, Kyoto, Japão), usando radiação monocromática $\text{Cu-K}\alpha_1$ ($\lambda = 1,54056\text{\AA}$), para confirmar a formação de nanocristais (NC_s) de TiO_2 , determinar a fase, tamanho médio e abundância relativa da fase anatase por rutila. O espectro de absorção foi obtido usando um duplo feixe de UV/VIS em espectrofotômetro NIR UV-3600 (Shimadzu-Nakagyo-ku, Kyoto, Japão), operando no modo de reflectância e com uma resolução espectral de 1nm. Os espectros de fluorescência foram registrados com um espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), utilizando um comprimento de onda de 325nm a partir de uma lâmpada de Xenon como fonte de excitação. Todas as caracterizações foram feitas à temperatura ambiente (Dantas *et al.*, 2008).

4.3- Teste de biocompatibilidade por meio de implantes subcutâneos

Animais:

Camundongos Balb/c, fêmeas, idade entre três a cinco semanas, pesando entre 20g a 30g foram utilizados para a execução dos experimentos. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e mantidos sob ciclos de iluminação (claro/escuro) de 12 horas, ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados com a aprovação prévia do Comitê de Ética na Utilização de Animais –CEUA/UFU - protocolo: 026/10 – aprovação final 101/10 em anexo.

Para a execução dos experimentos de implantes subcutâneos foram observados os critérios operacionais e de interpretação estabelecidos pela Federação Dentária Internacional (FDI) e Associação Dentária Americana (Documento 41 ANSI/ADA, 1980) com modificações. Os animais foram divididos em grupos controle e teste com períodos de observação de 15 dias, 30 e 90 dias. Para cada período de observação foram selecionados cinco animais para cada grupo.

Os implantes subcutâneos foram realizados no dorso dos animais em número de dois por animal, após a anestesia com $2,5 \times 10^{-3}$ ml de Cloridrato Xilazina 2% (Xilazin[®], Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) associado a 25×10^{-3} ml de Cloridrato Cetamina 10% (Cetamin[®], Rhobifarma) em $222,5 \times 10^{-3}$ ml de água deionizada. O volume foi administrado com auxílio de seringas descartáveis de insulina de 1ml (Plastipak[®], BD, Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) via intraperitoneal (i.p.), na posologia de 0,1ml por 10g/peso do animal (peso médio dos animais de 25g). Em média utilizou-se o volume de 0,25ml da solução anestésica. Após a administração anestésica, os animais ficaram em observação até completa sedação e caso necessário se fazia uma complementação anestésica. Posteriormente, os animais foram tricotomizados e submetidos a procedimentos de antisepsia com álcool 70%.

Os implantes subcutâneos de nanocristais de TiO_2 na fase mista anatase e rutila com cristais de diâmetros em média de 8,5nm foram preparados em forma de uma pasta em uma concentração de 25mg/ml, sendo 25mg (0,025g) do nanopó de TiO_2 em 1ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil), 1g/kg de peso corporal, formando assim uma espécie de massa hidratada que foi subsequentemente implantada no dorso dos animais com auxílio de uma agulha epidural com trocáter (70mm X 3mm) (Figura 2). Durante o período de observação os animais foram acompanhados diariamente a fim de se avaliar qualquer alteração de comportamento e/ou saúde.

Após o período de observação de 15, 30 e 90 dias, as áreas dos implantes foram dissecadas para remoção dos implantes e dos tecidos adjacentes (Figura 3). Uma vez removidas, as peças cirúrgicas foram divididas em três partes e processadas convenientemente como segue: 1) para os procedimentos de análise histológica, parte do material foi fixada em solução de formaldeído a 10% pelo período mínimo de 24 horas e no máximo 72 horas; 2) para dosagem de citocinas parte do material foi macerado e inserido em solução inibidora protease (Complete Tablets[®], Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, Alemanha) e armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração e mensuração das citocinas; e 3) para análise por microscopia eletrônica, uma parte foi seccionada em fragmentos de 1x1 mm² inserida em glutaraldeído a 2,5% (pH 7,2 - 7,4) por 72h (Figura 3D) (Xie *et al.*, 2011).

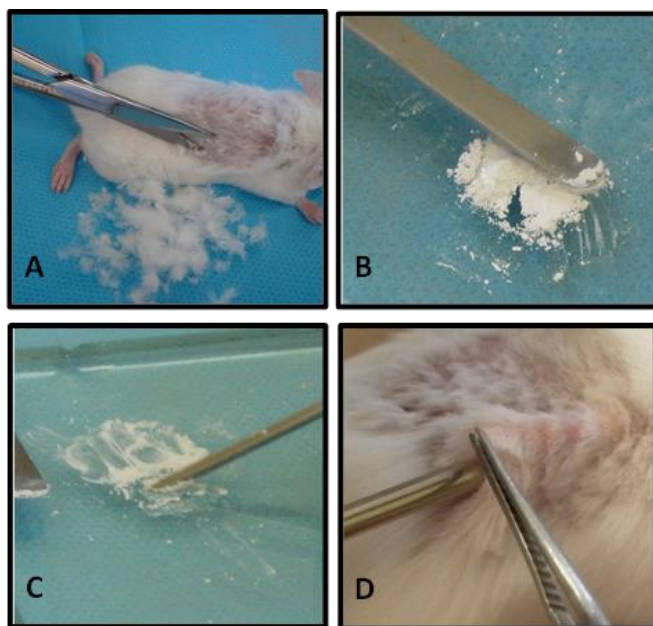


Figura 2- Inserção de implantes de NCs TiO_2 (25mg/ml). (A) Tricotomia da região dorsal, alvo do implante; (B) Manipulação de pasta de NC TiO_2 ; (C) Agulha epidural com trocáter sendo carregada com pasta de nanocristais de TiO_2 ; (D) Inserção do implante no tecido subcutâneo.

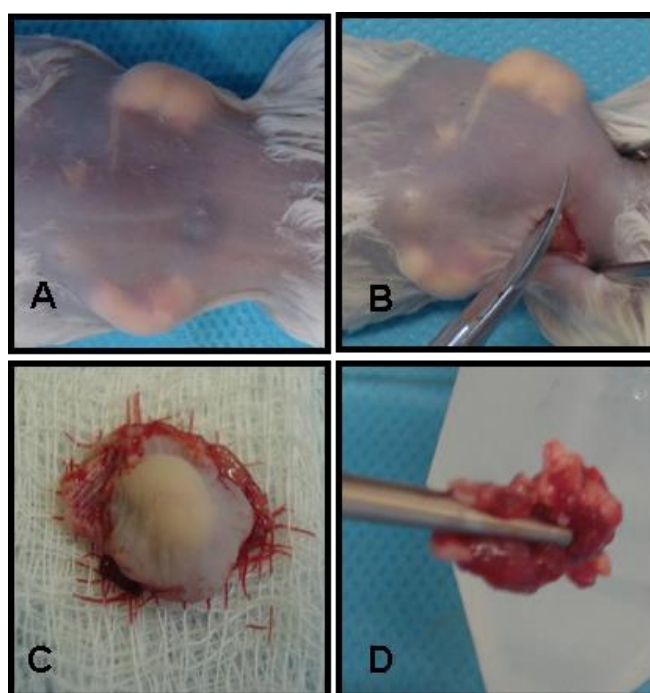


Figura 3- Remoção de implantes de NCs TiO_2 . (A) Visão da área do implante após tricotomia; (B) Remoção do fragmento tecidual contendo o material implantado; (C) Fragmento tecidual de pele contendo implante após remoção; (D) Fragmento da área do implante após a maceração.

4.4 - Processamento tecidual

Após a fixação em formaldeído a 4% as peças cirúrgicas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de formol, desidratadas em soluções de etanol de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) e diafanizadas em três banhos de xilol PA. Em seguida, o material foi impregnado de parafina para sua posterior inclusão em blocos com a utilização de formas próprias, adequados à obtenção de cortes histológicos. Todo o processo de desidratação, diafanização e impregnação de parafina foi realizado de forma automática em processador automático de tecidos (Lupetec PT-05, São Paulo, São Paulo, Brasil). As secções seriadas com espessura de 3µm foram obtidas em micrótomo Leica 2045 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), distribuídas uniformemente em lâminas de vidro, de forma a amostrar toda a área do implante. As secções histológicas foram submetidas à diafanização em xilol PA (três banhos), hidratadas em soluções de etanol e água em diluições decrescentes (100%, 90%, 80%, 70%) coradas pelo método de hematoxilina e eosina. Todas as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro em resina sintética (Permout™ Mounting Medium, BioWORLD, Dublin, Ohio, USA) (Michalany, 1990; Umbreit *et al.*, 2011).

4.5 - Análise histológica ao Microscópio de Luz

Os implantes subcutâneos foram avaliados considerando, a princípio, a análise qualitativa e semiquantitativa da resposta inflamatória local. Para tanto, utilizou-se microscópio de luz visível com conjunto óptico para aumentos de 4, 10, 40 e 100X. De cada espécime foram analisadas oito lâminas histológicas, cada uma contendo de 8 a 10 secções histológicas.

Toda a avaliação dos espécimes foi realizada de acordo com as normas da FDI (Federation Dentaire Internationale), seguindo os seguintes critérios microscópicos descritivos:

1. A presença ou ausência de necrose,
2. Tipo e intensidade da resposta inflamatória,
3. Transporte do material à distância, em vasos e células,
4. Alterações em vasos e nervos.

A intensidade da reação inflamatória foi estabelecida de forma descritiva seguindo os critérios (FDI):

- Ausente: Ausência de reação inflamatória.
- Suave: Escassas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo.
- Moderada: Grande quantidade de células inflamatórias dispostas focalmente.
- Intensa: Grande quantidade de células inflamatórias difusas no tecido conjuntivo adjacente.

Avaliação:

A severidade da resposta celular dita a aceitabilidade de um material ou método. De acordo com o critério da FDI.

Interpretação:

A interpretação dos resultados e análises obtidos para demonstrar a aceitação ou rejeição do material foi baseada no seguinte:

- a) Nenhuma ou suave reação inflamatória nos dois períodos(15 e 90 dias) é aceitável. Nenhuma ou suave reação inflamatória aos 15 dias, que aumenta no período subsequente para moderada ou severa é **não aceitável**.
- b) Reação moderada aos 15 e 90 dias é **não aceitável**.
- c) Reação moderada aos 15 dias, que diminui aos 90 dias é **aceitável**.
- d) Reação severa em qualquer período é **não aceitável**.

Neste caso, a avaliação foi realizada tendo como parâmetro a área próxima à interface do material com o tecido do hospedeiro.

4.6 – Análise histológica ao microscópio eletrônico de transmissão

Os fragmentos teciduais removidos dos animais do experimento de implante subcutâneo foram preparados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Os fragmentos foram fixados com solução de glutaraldeído a 2,5% (pH 7,2 - 7,4) por 72h, logo em seguida lavados por cinco vezes em tampão de PBS (pH 7,2 - 7,4) (Phosphate Buffered Saline System- GIBCO® ,Grand Island, New York) 4°C sendo que as duas últimas lavadas foram realizadas com intervalo de cinco minutos cada. A pós-fixação dos fragmentos foi realizada em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% por 1h e logo em seguida por mais 30 minutos com ferrocianeto de potássio. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em crescentes níveis de acetona, embebidos em resina epóxi (EPON™ Epoxy Resins, Modifiers & Curing Agents- Momentive Specialty Chemicals-Houston, TX, USA) e cortados inicialmente a $1\mu\text{m}$ e depois em cortes menores com ultramicrotomo a 60nm, corados com acetato de uranila a 1% e citrato de chumbo.

As imagens foram capturadas por um microscópio eletrônico de transmissão (Electron Microscope EM 109 - Zeiss, West, Germany) acoplado a uma câmara Megaview G2 Olympus (Vamanu *et al.*, 2008; Onuma *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011; Pujalté *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2011). As análises foram realizadas com o objetivo de identificar alterações morfológicas ultraestruturais que pudessem ser associadas à presença de $\text{NC}_5 \text{TiO}_2$ no interior ou próximo à superfície externa das células no tecido receptor do implante.

4.7- Obtenção da solução estoque de nanocristais de TiO_2

Os nanocristais de TiO_2 na fase mista anatase-rutila com partículas de diâmetros em média de 8,5nm foram misturados com água deionizada estéril na concentração inicial de 1mg/ml para a solução estoque. Para esterilização da solução utilizou-se um filtro: Syringe Filter PTFE Membrane 50mm (Nalgene Filtration Products, Nalgene Nunc International, Rochester,

NY, USA). Em função desta etapa, os cálculos de concentração do nanopó foram refeitos considerando a pesagem do filtro antes (2,63g) e após a filtração (3,03g), descontando-se o peso dos nanocristais (0,4g) e fazendo-se novo ajuste do volume final adicionando água deionizada estéril para que a concentração final atingisse 1mg/ml.

Para obtenção das diversas soluções de trabalho nas cinco concentrações finais que seriam testadas (10, 20, 40, 100 e 200µg/ml), alíquotas da solução de estoque foram diluídas em PBS estéril, obtendo-se, assim, cinco frascos de soluções de trabalho (Vamanu *et al.*, 2008; Bihari *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2005, 2009).

4.8 - Obtenção de macrófagos peritoneais

Para a ativação e obtenção de macrófagos peritoneais camundongos Balb/c fêmeas de três a cinco semanas de vida foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p) com solução de tioglicolato 1% (Difco™ Fluid Thioglycollate Medium, BD-Biosciences, San Diego, CA, USA) no volume de 1,0ml. Após o período de 72h os macrófagos peritoneais foram coletados por meio de lavagem peritoneal com 5ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Vitrocell-Comércio de Produtos para laboratórios Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) com subsequente quantificação utilizando um hemocítmetro (Câmara de Neubauer) (Labor-Optik GmbH, Friedrichsdorf, Germany).

4.9 - Cultura celular

As células obtidas foram semeadas em dez placas de 24 poços (Zellkulturtestplatten-Techno Plastic Products AG, Zollstrasse, Trasadingen, Schweiz) a 1×10^5 células por poço, colocadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 1% de antibióticos (benzilpenicilina potássica, sulfato de

streptamicina e sulfato de gentamicina – Vitrocell Embriolife Comércio Produtos de Laboratório Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell-Comércio de Produtos para laboratórios Ltda. São Paulo, São Paulo, Brasil) por 24h a 37° em atmosfera contendo 5% de CO₂ para estabilização e aderência. Após o período de incubação foram realizadas lavagens com PBS para retirada das células não aderidas.

A fim de se obter sobrenadantes da cultura celular sob tratamento com os nanocristais, foi adicionado novo meio de cultura DMEM 10% com as respectivas soluções de trabalho contendo os nanocristais de TiO₂ de concentrações finais diferentes (10, 20µg/ml) adicionadas aos respectivos poços das placas de cultura (triplicatas) em um volume final de 500µl por poço. O meio de cultura sem os nanocristais de TiO₂ serviu como controle positivo. Os tempos de exposição das células ao meio com nanocristais foram de 2, 12, 24, 72 horas. Após cada tempo o sobrenadante da cultura celular foi armazenado a -20°C para posteriores ensaios de dosagem de nitrito e dosagem de citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-12, INF-γ e IL-4). As amostras foram realizadas em triplicata e o experimento foi realizado em duplicata pelo mesmo operador, sob as mesmas condições (equipamentos e reagentes), em dias diferentes.

4.10 -Teste de viabilidade celular- MTT

O teste de viabilidade celular foi realizado utilizando-se o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), por meio de avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificada pela redução do MTT a formazan pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. Foram semeados macrófagos peritoneais em placas de 96 poços com 1 x 10⁵ células em 200µl por poço de meio de cultura DMEM, suplementado com antibióticos e SFB 10% por 24h a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂ para estabilização e aderência, sendo cada amostra em triplicata. Após o período de incubação

foram realizadas lavagens com PBS para retirada das células não aderidas. Em seguida, foi adicionado DMEM 10% contendo as diferentes concentrações dos nanocristais de TiO_2 pelo período de 72h. A suspensão de $\text{NC}_s \text{TiO}_2$ foi preparada a partir de uma solução de estoque a uma concentração inicial de 1mg/ml e então diluída em PBS para as concentrações finais propostas (10, 20, 40, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) (Liu *et al.*, 2010). O controle foi o meio de cultura com células sem contato com os $\text{NC}_s \text{TiO}_2$. Também foi quantificado o valor de absorbância do DMEM 10%, o qual foi subtraído dos valores de absorbâncias das amostras de controle a fim de minimizar possíveis interferências do meio. Após as 72h adicionou-se 20 μl de MTT a cada poço para uma concentração final de 2mg/ml em seguida as células foram incubadas durante 4h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . O meio de cultura foi em seguida removido cuidadosamente e 150 μl de DMSO (Dimetilsulfoxido-Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) foram adicionados e misturados com as células até que os cristais de formazan fossem dissolvidos completamente (Mosmann, 1983).

A reação foi medida num leitor de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) com um comprimento de onda de 570nm. A viabilidade celular foi expressa como uma percentagem da viabilidade da cultura de controle. Os valores de absorbância obtidos do DMEM10% foram debitados dos valores dos controles. E os valores de absorbâncias obtidos do controle (células sem tratamento) foram debitados dos valores de absorbância das amostras com células tratadas com nanocristais, a fim de que qualquer reação de alteração do meio com o produto fosse considerada (Dechsakulthorn *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Shichang *et al.*, 2010; Hsiao *et al.*, 2011).

As amostras foram ensaiadas em triplicata e o experimento foi realizado em duplicata, pelo mesmo operador, sob as mesmas condições (equipamentos e reagentes), em dias diferentes.

4.11 - Dosagem de citocinas dos tecidos subcutâneos

Foram obtidos sobrenadantes dos *pellets* coletados dos fragmentos de tecidos subcutâneos removidos dos animais implantados após os períodos de 15, 30 e 90 dias. Os fragmentos que haviam sido armazenados em solução de Complete Tablets[®] (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, Alemanha) a -20°C foram macerados e centrifugados a 10.000rpm por cinco minutos e o sobrenadante utilizado para dosagem de citocinas. Em síntese: placas de alta afinidade de 96 poços (EIA/RIA Plate-High Binding - 3590 Costar[®], Corning, NY, EUA) foram adsorvidas com o volume final de 100µl/poço do anticorpo monoclonal, específico para captura de cada citocina em triplicata. Para o cálculo do volume total (5ml) da solução diluída do anticorpo de captura, observou-se o protocolo de cada citocina, sendo utilizados tampão carbonato 0,1M (NaHCO₃/Na₂CO₃ - pH=9,5) para IL-4, IL-1 β e INF-γ e tampão fosfato 0,2M (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ - pH=6,5) para IL-12 e TNF-α. Após o preenchimento, as placas foram cobertas com Parafilm[®] M (American National Can Company, Norwalk, USA) para evitar a evaporação do líquido e incubadas *overnight* (18h) a 4°C, para completar a etapa de sensibilização.

Foram feitas três lavagens das placas com uma solução de PBS e TWEEN 20[®] (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate) (Sigma Aldrich, St. Quentin, Fallavier, France) (PBS-T) a 0,05% (1L de PBS para 500µl TWEEN20[®]) para todas as citocinas com exceção da citocina INF-γ para a qual a placa foi lavada cinco vezes conforme o protocolo do fabricante.

Para o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos de cada placa, foram utilizados 200µl de solução de PBS e SFB 10% por poço. As placas foram novamente cobertas com Parafilm[®] e mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T como descrito anteriormente. Para o ensaio da citocina INF-γ, foram realizadas cinco lavagens.

Para a confecção da curva padrão das diferentes citocinas investigadas, as frações recombinantes foram diluídas em água deionizada, conforme as concentrações expressas pelo fabricante para cada citocina. As concentrações iniciais foram de 500pg/ml (IL-4), 1000pg/ml(TNF- α), 2000pg/ml(IL-1 β e INF- γ), e 4000pg/ml(IL-12). A curva foi construída com um total de oito poços, em duplicata. Nos poços iniciais foi colocado o volume de 300 μ l das respectivas citocinas em suas concentrações iniciais (sem diluição); nos poços seguintes colocou-se, inicialmente, 150 μ l de PBS/SFB 10% e, em sequência, foi realizada diluição seriada, onde se retirou do primeiro poço 150 μ l da citocina e misturou-se ao volume de PBS e SFB10% do segundo poço. Em seguida, retirou-se o mesmo volume do segundo poço, homogeneizando e repassando para o terceiro poço e assim sucessivamente até o sétimo poço. No oitavo poço foi colocado apenas PBS/SFB 10%, sendo considerado como “branco”.

As amostras do sobrenadante de tecidos do experimento de implantes subcutâneos de NC_s TiO₂ foram colocadas em placas em triplicata 100 μ l por poço, sendo que o experimento celular teve como controle interno positivo o sobrenadante de tecidos subcutâneos que não recebeu o implantes. As placas foram seladas com Parafilm[®], incubadas a temperatura ambiente por 2h. Em seguida, foram lavadas cinco a sete vezes com PBS-T, de acordo com as respectivas recomendações do fabricante para cada citocina em particular.

A cada poço foi adicionado 100 μ l do anticorpo de detecção conjugado a biotina e adicionado ao reagente streptavidina (SAv-HRP). As placas foram seladas com Parafilm[®], mantidas a temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T por cinco ou sete vezes, sendo então adicionados a cada poço 100 μ l da solução de substrato enzimático TMB Substrate Reagent Set, BD Optéia[™] (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). O sistema foi então incubado por 30 minutos sem selamento, abrigado da luz, em temperatura ambiente.

Após o período de incubação a reação foi paralisada pela adição de 50 μ l por poço da solução de H₂SO₄ 2N.

As citocinas avaliadas foram TNF- α , IL-1 β , IL-12, INF- γ e IL-4. As amostras foram realizadas em triplicata e o experimento foi realizado em duplicata, pelo mesmo operador, sob as mesmas condições (equipamentos e reagentes), em dias diferentes.

4.12 - Dosagem de nitrito pela reação de Griess.

A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase em solução de redução (Green *et al.*, 1982).

Para tal reação foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (SPL, Life Sciences Inc- Pocheon-si, Gyeonggi-do, South Korea) onde foram depositados 50 μ l de cada amostra em triplicata. A redução de nitrato nas amostras do sobrenadante de cultura celular foi realizada pela incubação com tampão de redução contendo nitrato redutase (Sigma-Aldrich, St. Quentin, Fallavier, France) a 37°, por 30 minutos. Seguiu-se a detecção do nitrito com a adição 50 μ l de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% e N-(1-naftil) etilenodiamida dihidrocloridrato a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% nos poços reservados para a curva e nos poços que continham o sobrenadante da cultura celular. Seguiu-se a produção de solução estoque a 1M para elaboração de curva padrão contendo NaNO₃. A curva foi iniciada a partir da concentração de 200 μ M com diluição na razão dois, em água destilada. As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação da curva padrão de NaNO₂ e os dados expressos em μ moles de nitrito e nitrato.

Após dez minutos, absorbância foi medida a 540nm usando um leitor automático de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (Onuma *et al.*, 2009).

As amostras foram ensaiadas em triplicata e o experimento foi realizado em duplicata, pelo mesmo operador, sob as mesmas condições (equipamentos e reagentes), em dias diferentes.

4.13 - Dosagem das citocinas a partir da cultura de macrófagos peritoneais desafiados por nanocristais de TiO₂

A quantificação das citocinas de sobrenadantes produzidos por cultura celular de macrófagos peritoneais expostos aos nanocristais de TiO₂ foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando pares de anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente. Foram utilizados Kits de anticorpos monoclonais (BD Optéia™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) para as seguintes citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-12, INF- γ e IL-4.

Em resumo, placas de alta afinidade de 96 poços (EIA/RIA Plate-High Binding - 3590 Costar®, Corning, NY, EUA) foram adsorvidas com o volume final de 100 μ l/poço do anticorpo monoclonal, específico para captura de cada citocina em triplicata. Para o cálculo do volume total (5ml) da solução diluída do anticorpo de captura, observou-se o protocolo de cada citocina, sendo utilizados tampão carbonato 0,1M (NaHCO₃/Na₂CO₃ - pH=9,5) para IL-4, IL-1 β e INF- γ e tampão fosfato 0,2M (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ - pH=6,5) para IL-12 e TNF- α . Após o preenchimento, as placas foram cobertas com Parafilm® M (American National Can Company, Norwalk, USA) para evitar a evaporação do líquido e incubadas *overnight* (18h) a 4°C, para completar a etapa de sensibilização.

Foram feitas três lavagens das placas com uma solução de PBS e TWEEN 20® (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate) (Sigma Aldrich, St. Quentin, Fallavier, France) (PBS-T) a 0,05% (1L de PBS para 500 μ l TWEEN20®) para todas as citocinas com exceção da citocina INF- γ para a qual a placa foi lavada cinco vezes conforme o protocolo do fabricante.

Para o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos de cada placa, foram utilizados 200 μ l de solução de PBS e SFB 10% por poço. As placas foram novamente cobertas com Parafilm® e mantidas em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T como descrito anteriormente. Para o ensaio da citocina INF- γ , foram realizadas cinco lavagens.

Para a confecção da curva padrão das diferentes citocinas investigadas, as frações recombinantes foram diluídas em água deionizada, conforme as concentrações expressas pelo fabricante para cada citocina. As concentrações iniciais foram de 500pg/ml (IL-4), 1000pg/ml(TNF- α), 2000pg/ml(IL-1 β e INF- γ), e 4000pg/ml(IL-12). A curva foi construída com um total de oito poços, em duplicata. Nos poços iniciais foi colocado o volume de 300 μ l das respectivas citocinas em suas concentrações iniciais (sem diluição); nos poços seguintes colocou-se, inicialmente, 150 μ l de PBS/SFB 10% e, em sequência, foi realizada diluição seriada, onde se retirou do primeiro poço 150 μ l da citocina e misturou-se ao volume de PBS e SFB10% do segundo poço, logo em seguida retirou-se o mesmo volume do segundo poço, homogeneizando e repassando para o terceiro poço e assim sucessivamente até o sétimo poço. No oitavo poço foi colocado apenas PBS/SFB 10%, sendo considerado como “branco”.

As amostras do sobrenadante da cultura celular de macrófagos peritoneais tratados com NC_s TiO₂ foram colocadas em placas em triplicata 100 μ l por poço, sendo que o experimento celular teve como controle interno positivo o sobrenadante da cultura celular que não recebeu o tratamento. As placas foram seladas com Parafilm[®], incubadas a temperatura ambiente por 2h. Em seguida foram lavadas cinco a sete vezes com PBS-T, de acordo com as respectivas recomendações do fabricante para cada citocina em particular.

A cada poço foi adicionado 100 μ l do anticorpo de detecção conjugado a biotina e adicionado ao reagente streptavidina (SAv-HRP). As placas foram seladas com Parafilm[®], mantidas a temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T por cinco ou sete vezes, sendo então adicionados a cada poço 100 μ l da solução de substrato enzimático TMB Substrate Reagent Set, BD Optéia[™] (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). O sistema foi então incubado por 30 minutos sem selamento, abrigado da luz, em temperatura ambiente.

Após o período de incubação a reação foi paralisada pela adição de 50 μ l por poço da solução de H₂SO₄ 2N.

A leitura dos níveis de absorbâncias foi feita a 450nm por uma leitora automática de ELISA SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de citocinas nas amostras foi determinada em pg/ml por meio de análise de regressão com as absorbâncias obtidas de uma curva-padrão pré-estabelecida com quantidades conhecidas da respectiva citocina recombinante realizada simultaneamente (Scherbart *et al.*, 2011).

O experimento foi realizado em triplicata, pelo mesmo operador, sob as mesmas condições (equipamentos e reagentes), em dias diferentes.

4.14 - Análise estatística:

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Prisma version 5.0 for Windows, San Diego, CA, USA). Primeiramente, a normalidade das amostras foi testada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov e identificou-se que os dados foram não paramétricos. Em função desta observação, as análises de comparação foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste Bonferroni para todas as análises, a saber: comparação dos níveis de viabilidade celular, comparação dos níveis de óxido nítrico, comparação dos níveis de citocinas no tecido subcutâneo e em cultura de macrófagos desafiados com NC_s TiO₂. O nível de significância para todas as análises foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5- RESULTADOS

Após o processo de síntese, o pó obtido foi caracterizado a fim de confirmar a formação das nanopartículas de TiO_2 , aferindo suas propriedades estruturais (classificação, dimensão, fase e pureza) e ópticas.

5.1- Propriedades estruturais dos nanocristais de TiO_2

A Figura 4 mostra o difratograma de Raios-X (DRX) das nanopartículas de TiO_2 , em que os picos de difração de Bragg são característicos de nanocristais TiO_2 , nas fases anatase (JCPDS: 1:21-1272) e rutila (JCPDS: 1:21-1276) como indicados, respectivamente, pelos símbolos (*) e (**). Os $\text{NC}_s \text{TiO}_2$ têm um tamanho médio em torno de 8,5 nm. Este tamanho médio dos $\text{NC}_s \text{TiO}_2$ foi determinado pela fórmula de Scherrer $\tau = (K\lambda/\beta\cos\theta)$, onde K é o fator de forma (0,9 para grãos esféricos), λ é o comprimento de onda de Raios-X ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), β é a largura da meia altura da intensidade máxima de um pico de difração de Bragg, dada em radianos, e θ (teta) é ângulo de Bragg. Isto, considerando o pico de difração de Bragg (101) da fase anatase, localizado em torno de $2\theta = 25,4^\circ$. A fração da fase rutila é de 0,34, que foi calculada com base na equação $W_r = A_r / (A_r + 0,88 A_a)$, onde A_r e A_a são as intensidades integradas, respectivamente, dos picos (110) da rutila e (101) da anatase (Zangh *et al.*, 2000; Yu *et al.* 2003).

Diante dos resultados verificou-se que os $\text{NC}_s \text{TiO}_2$ têm tamanho médio em torno de 8,5nm e fase mista (anatase e rutila), em que a fase anatase é predominante em relação a rutila. Correspondendo desta forma 34% fase rutila e 66% fase anatase, uma vez que foi verificado a cristalinidade do TiO_2 .

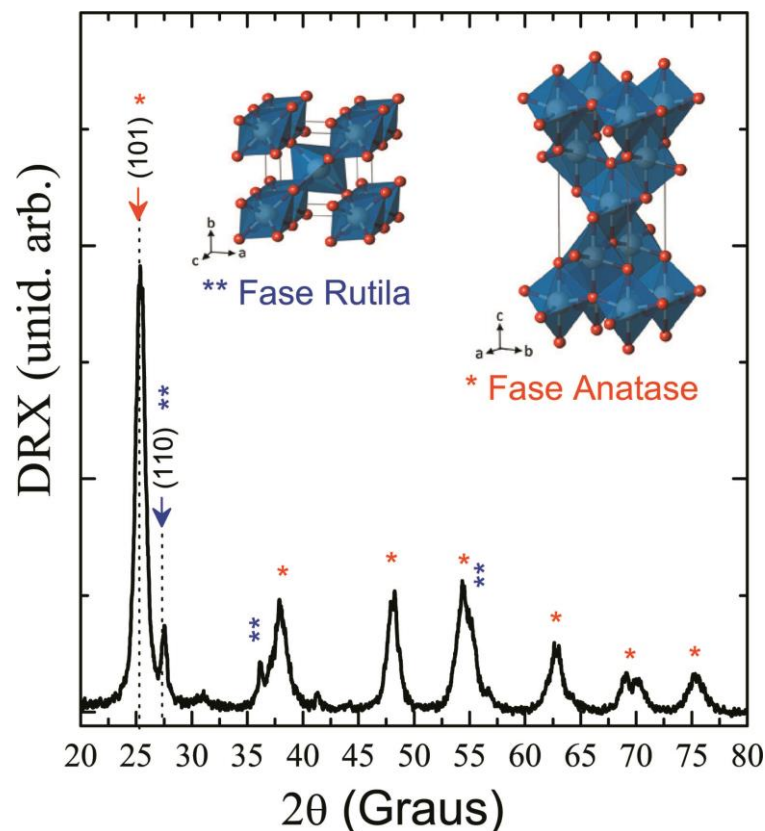


Figura 4 - Difratoograma de Raios-X dos NC_s TiO₂ com fases (*) anatase e (**) rutila.

A Figura 5 mostra o espectro micro-Raman dos NC_s TiO₂. Verifica-se a presença de bandas características de vibrações da fase anatase e rutila. A fase anatase do nanocrystal *bulk* TiO₂ apresenta seis modos ativos em Raman localizados em 144 cm⁻¹ (Eg), 197 cm⁻¹ (Eg), 399 cm⁻¹ (B1g), 513 cm⁻¹ (A1g), 519 cm⁻¹ (B1g), e 639 cm⁻¹ (Eg) (Ohsaka *et al.* 1980). Entretanto, no espectro da amostra sintetizada as bandas estão deslocadas para maiores frequências. Este efeito é associado com a diminuição de tamanho dos nanocristais. A banda Raman em torno de 144 cm⁻¹ não foi visualizada, devido o detector do sistema Raman utilizado variar de 150 a 1000 cm⁻¹, verificando apenas a descida da banda. Além disso, não se observou modos vibracionais de outras nanoestruturas, garantindo, desta forma, alto grau de pureza dos nanocristais de TiO₂.

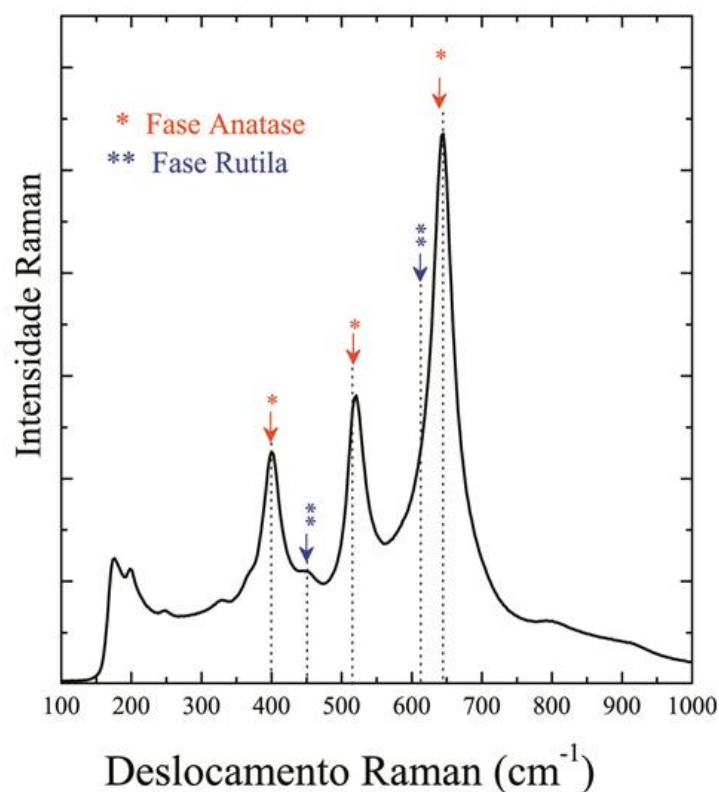


Figura 5 - Espectros micro Raman dos nanocristais de TiO₂.

5.2- Propriedades ópticas dos nanocristais de TiO₂

A Figura 6 mostra os espectros de absorção óptica (AO) e de fluorescência (FL) dos nanocristais de TiO₂. Observa-se no espectro de AO e FL que os nanocristais de TiO₂ absorvem e luminescem no ultravioleta. Além disso, verifica-se que a banda de absorção dos nanocristais de TiO₂ está localizada em comprimentos de onda menor do que o do TiO₂ *bulk* (>10nm) (413,26 nm – rutila e 387,4 nm – anatase). Isto confirma que as nanoestruturas crescidas são denominadas como nanocristais que apresentam efeitos de confinamento quântico (pontos quânticos (PQs)). Nos espectros de fluorescência pode-se observar a presença de três bandas, uma correspondente a transição excitônica e outras duas que são atribuídas a vacâncias de oxigênio.

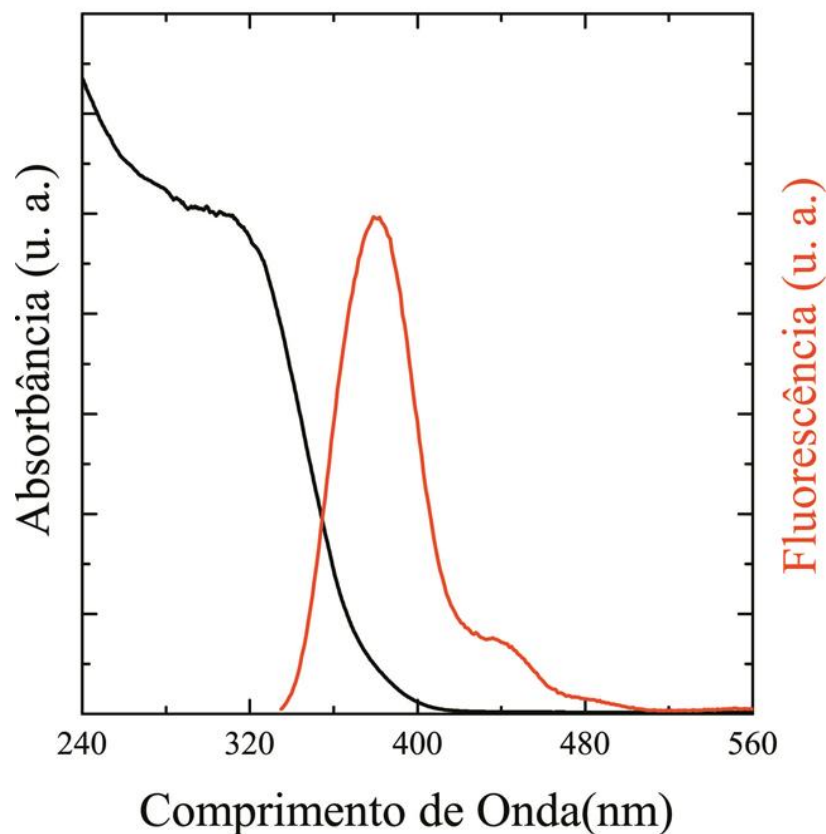


Figura 6 - Espectros de absorção óptica e de fluorescência dos nanocristais de TiO_2 .

5.3- Resposta tecidual aos implantes subcutâneos de nanocristais de TiO_2

5.3.1- Análise ao microscópio de luz da resposta tecidual subcutânea ao implante de nanocristais de TiO_2

Em todos os períodos estudados, pode-se perceber que a inserção do material se deu de forma satisfatória, traduzida pela concentração do material que se encontrava predominantemente agregado, formando um concentrado ovóide, bem delimitado no tecido subcutâneo do camundongo. Não raro, o material também foi observado entre as fibras musculares paracostais ou também disperso em pequenos agregados externamente a maior parte do conteúdo implantado.

15 dias:

Neste período de observação pode-se perceber a presença de tecido conjuntivo denso, não modelado, rico em células, dispostos concentricamente em torno de todo o material implantado, delineando a cápsula. Pode-se verificar a presença em maior densidade de células fusiformes, sugestivas de fibroblastos e macrófagos algumas das quais contendo material na área citoplasmática, e outros leucócitos como linfócitos e polimorfonucleares neutrófilos, mastócitos e inúmeros vasos sanguíneos. Na região do implante, evidenciou-se, na sua porção central, a presença de exsudato sero-fibrino-hemorrágico, por vezes associado à presença de tecido conjuntivo frouxo, rico em células, especialmente fibroblastos e células sugestivas de miofibroblastos, junto à neo-angiogênese. Foi marcante a presença de hemorragia nas regiões centrais do implante. Infiltrado inflamatório granulomatoso inespecífico (tipo corpo estranho) caracterizado pela presença de macrófagos mononucleares, células gigantes multinucleares tipo corpo estranho. Menos evidenciadas células mononucleares menores, sugestivas de linfócitos e polimorfonucleares neutrófilos, também puderam ser evidenciadas permeando os nanocristais de TiO_2 . Foi possível perceber neste período a formação de septos de tecido conjuntivo entrecortando o material implantado, caracterizado por grande densidade celular. Foi também notória a presença de granulações de nanocristais nas áreas ocupadas por macrófagos mononucleares, macrófagos gigantes tipo corpo estranho e fibroblastos. No tecido muscular externamente à cápsula, grumos de nanocristais foram identificados sobrepostos às células do endo e perimísio. Não obstante, não foi possível identificar sinais de necrose ou apoptose nas células musculares. Tecido adiposo, tecido neural, folículo piloso, glândulas sebáceas, mostravam características usuais de normalidade. As Figuras de 7 a 10 ilustram os aspectos histológicos descritos acima.

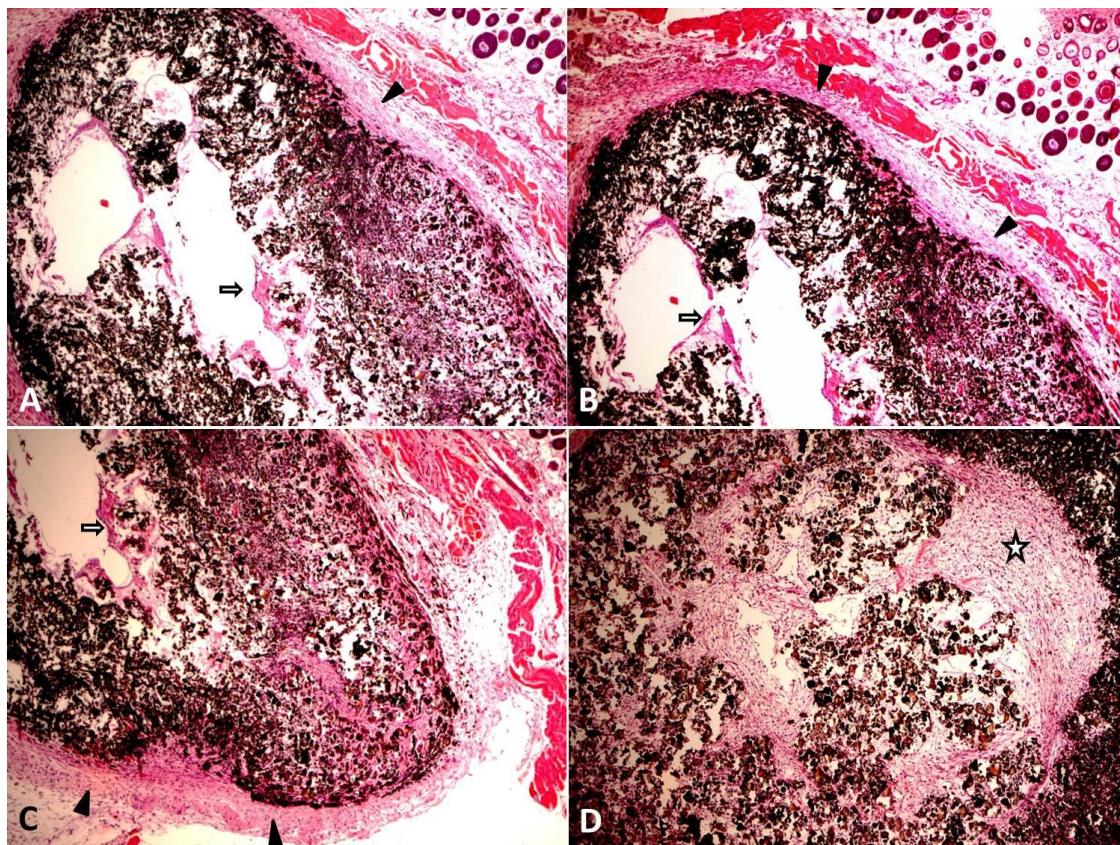


Figura 7- Os cortes histológicos evidenciam diferentes áreas do implante de NC_s TiO₂ no período de 15 dias. Pode-se perceber a presença de tecido conjuntivo organizado concentricamente ao longo da superfície do material implantado (cabeça de seta preta). Nas figuras (A), (B) e (C) percebem-se áreas claras centrais sugestivas de edema e coágulos eosinófilos representando material sero-fibrino-hemorrágico (setas) representando áreas de maior concentração de líquido (edema) no material. Septos de tecido conjuntivo mostrando diferentes dimensões e grande densidade celular são bem visualizados nas figuras (C) e (D) (*) (Hematoxilina/eosina, aumento original: 50x).

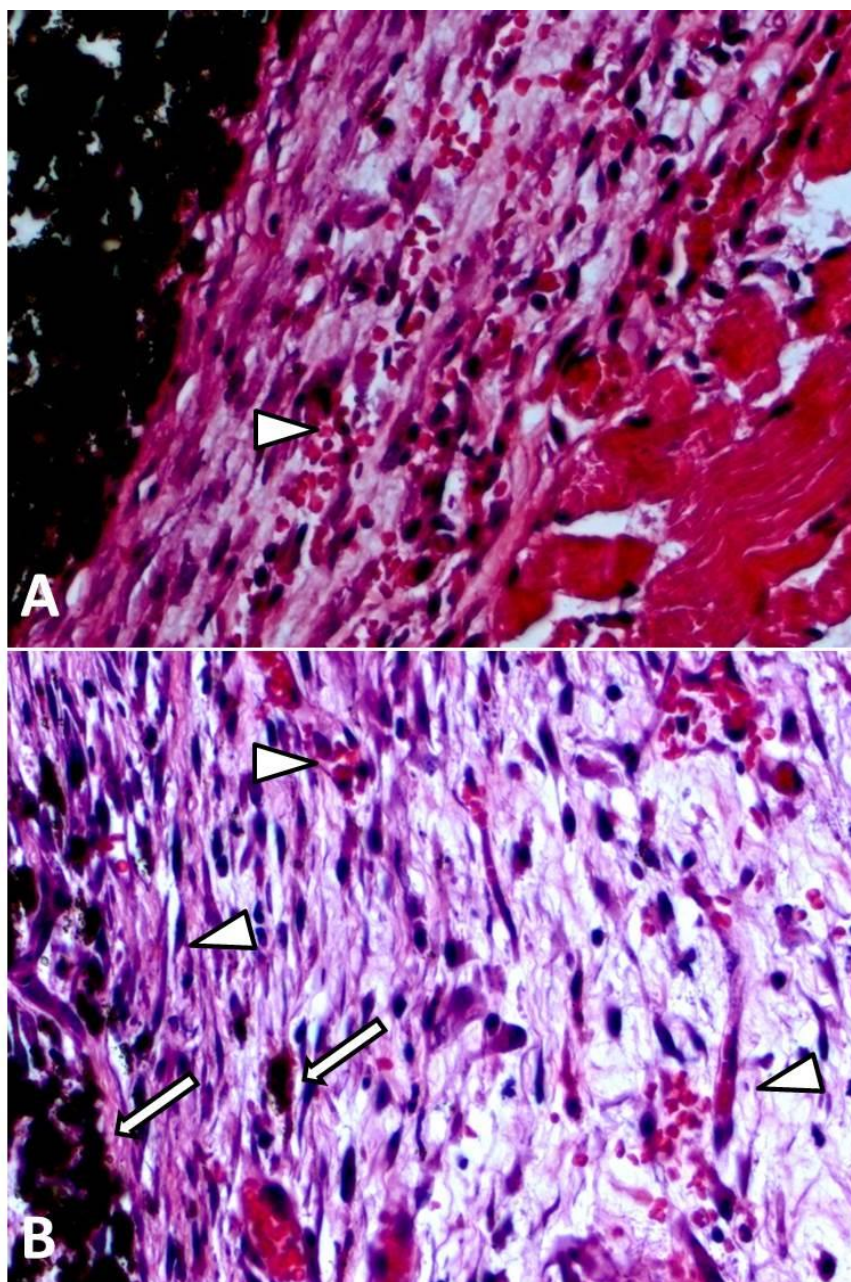


Figura 8 – Região capsular da área do implante de NC_s TiO₂ (8,5 nm)(15 dias). Em (A) e (B) o material implantado encontra-se no lado esquerdo das figuras. Percebe-se que a cápsula é densamente celularizada, com deposição de matriz extracelular fibrilar, permeada por fibroblastos (células fusiformes), eventuais macrófagos carregados de nanocristais (setas), vasos capilares hiperêmicos que se confundem com focos de hemorragia (cabeças de setas). (Hematoxilina/eosina, aumento original 200x).

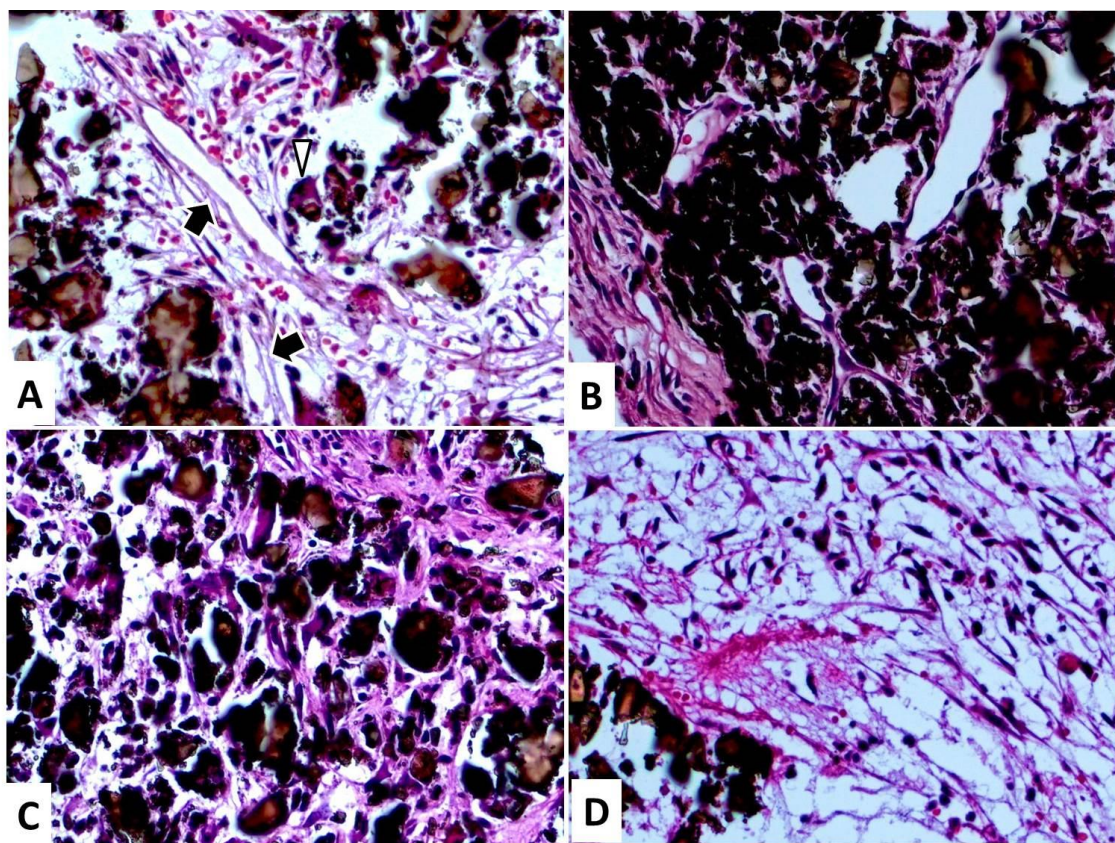


Figura 9 - Visão ampliada de área do implante subcutâneo de NCs TiO_2 (15 dias) mostrando em (A) vasos sanguíneos capilares (setas), macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho se amoldando a uma estrutura cristalina (cluster) de NCs TiO_2 . Em (B), detalhe dos vasos sanguíneos identificados como espaços claros elípticos ramificados, entrecortando a área do implante, repleta de macrófagos. (C) Área do implante mostrando aglomerado de macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho repletas de NCs TiO_2 . Em (D), pode-se perceber uma área do implante mostrando tecido conjuntivo ricamente celularizado, com grande número de células fusiformes e estrelárias (sugestivas de fibroblastos e miofibroblastos), macrófagos mononucleares, linfócitos e vasos capilares. Esta região corresponde a uma área do implante permeada por um septo conjuntivo em fase inicial de organização (Hematoxilina/eosina, aumento original 400x).

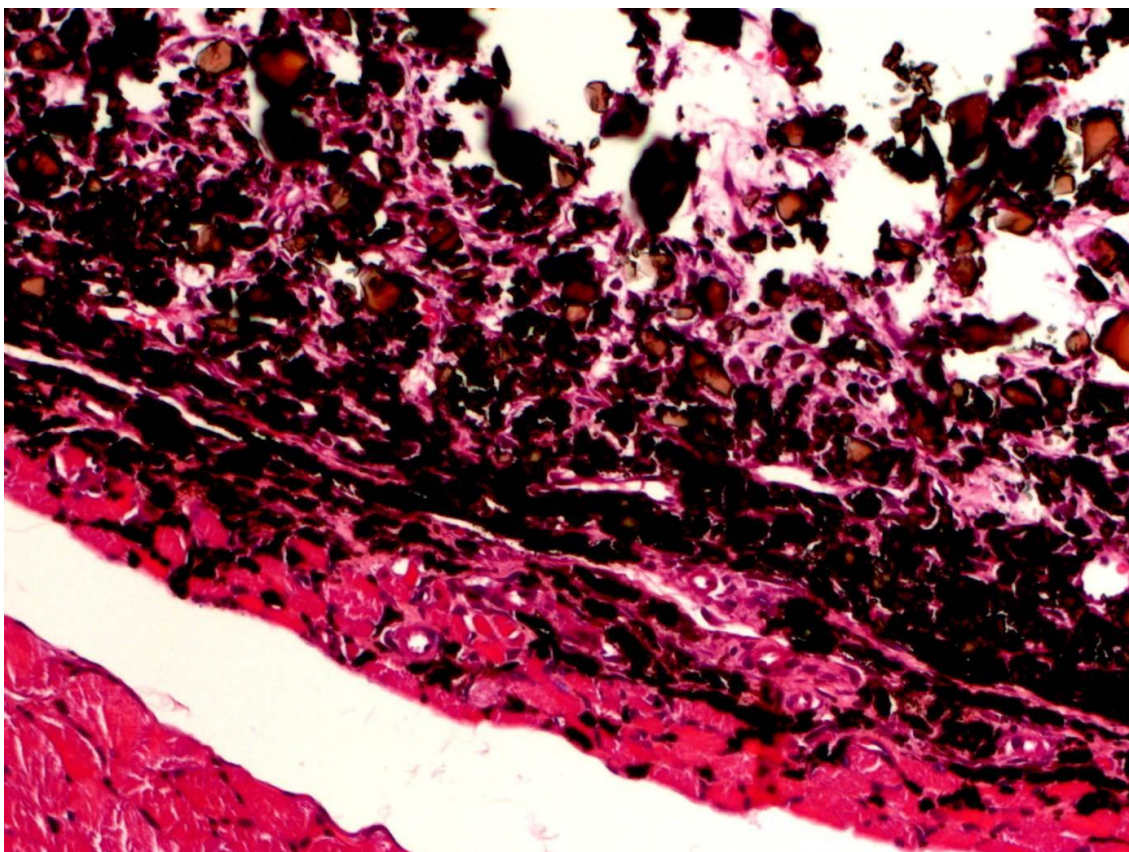


Figura 10 - Região periférica a área do implante de NC_s TiO₂ (15 dias) limítrofe ao tecido muscular adjacente, mostrando áreas das fibras musculares permeadas por aglomerados de NC_s TiO₂, que se localizam sobre os fibroblastos do endomísio e perimísio (Hematoxilina/eosina, aumento original: 200x).

90 dias:

Todas as secções histológicas mostraram o depósito bem circunscrito de NC_s TiO₂, delimitado por uma cápsula fibrosa fina, moderadamente celularizada, ainda com resquícios de macrófagos, linfócitos e fibroblastos e poucos vasos sanguíneos. Esta cápsula foi notadamente percebida na região do implante voltada para o tecido subcutâneo, e menos frequentemente observada na região periférica à musculatura, quando o material encontrava-se localizado entre as fibras musculares. Sua espessura foi flagrantemente reduzida em relação àquela observada para os implantes

avaliados em 15 dias. Células ovóides e fusiformes, sugestivas de macrófagos e fibroblastos puderam ser observadas na cápsula associadas à presença de NC_s TiO₂. Áreas focais de tecido conjuntivo frouxo, constituído por matriz de aspecto fibrilar, permeadas por macrófagos, linfócitos, fibroblastos e mastócitos também puderam ser observadas ao longo da cápsula do implante. Na área do implante propriamente dita, pode-se perceber inúmeras trabéculas de tecido conjuntivo, não modelado, com áreas alternadas de maior e menor densidade celular e matricial; em outras áreas era nítida a presença de finas trabéculas de tecido conjuntivo identificáveis apenas pela presença de vasos sanguíneos capilares, com formas e dimensões variadas, por vezes hiperêmicos. Em algumas regiões, a matriz extracelular era extremamente homogênea, eosinófila, com sinais de hialinização, na qual se observavam inclusões celulares, delineando, grosseiramente, um padrão morfológico osteóide. Macrófagos, especialmente mononucleares, puderam ser observados permeando toda a extensão do material implantado, associado à células fusiformes, sugestivas de fibroblastos/miofibroblastos, aparentemente carregados de nanocristais, o que, muitas vezes, desfavoreceu a identificação de limites citoplasmáticos e, por vezes, o próprio núcleo celular. Os septos de tecido conjuntivo cortavam o material implantado em diferentes regiões, formando uma estrutura alveolar rica em nanocristais, macrófagos mononucleares e multinucleares e raros neutrófilos. Macrófagos mononucleares ricos em granulações citoplasmáticas puderam ser observados mais restritos as regiões periféricas do implante. Um aspecto interessante observado é que muitas estruturas cristalinas do TiO₂ apresentavam-se com grandes dimensões, refringentes e vítreas, com diversos tons de marrom. Poucos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e pequenas áreas de hemorragia também foram observados. Neste período, pode-se perceber também, aglomerados de células multinucleares, compatíveis com macrófagos multinucleares do tipo corpo estranho, com formas, e tamanhos variados, tendo também número e distribuição nuclear citoplasmática variável. Comumente, estas células mostravam nanocristais de TiO₂ sobrepostos à área citoplasmática. Não era incomum verificar células se amoldando

morfologicamente ao material implantado que estava sendo envolvido por ela. Estes achados caracterizaram a presença de uma reação granulomatosa inespecífica (tipo corpo estranho) como principal tipo de reação inflamatória reacional a presença do material implantado.

Em ambos os períodos de observação pudemos observar a presença de nanocristais em linfonodos, usualmente associados a células ovóides, grandes, sugestivas de macrófagos e ou células fusiformes sugestivas de fibroblastos. Estas coleções celulares foram observadas em diferentes regiões do linfonodo, mais notadamente em seio subcapsular, região cortical, paracortical e seios medulares. Apenas em um caso foi possível observar discreta área de necrose e exsudato serofibrinoso na região central da área do implante.

Na musculatura adjacente ao material implantado, foi possível verificar células do endomísio, perimísio e epimísio com material nanoparticulado ocupando área correspondendo ao citoplasma celular. Não foi possível evidenciar objetivamente nanocristais no citoplasma das células musculares. Não observamos alterações morfológicas nas células adiposas do tecido adiposo subcutâneo, e nas células das glândulas sudoríparas, e do aparelho pilossebáceo. Ademais, tecido ósseo coletado neste material correspondente a costelas apresentava-se constituído em parte por cartilagem e medula óssea hematopoiética. Nestes tecidos, não foi possível verificar a presença aparente de nanocristais de TiO_2 . As Figuras de 11 a 14 ilustram os aspectos histológicos descritos anteriormente.

Baseado na análise dos cortes histológicos corados pelo método de Von Kossa, não foi possível identificar sinais de mineralização na matriz extracelular hialinizada que permeou o material implantado em nenhum dos animais testados, considerando os diferentes períodos de observação.

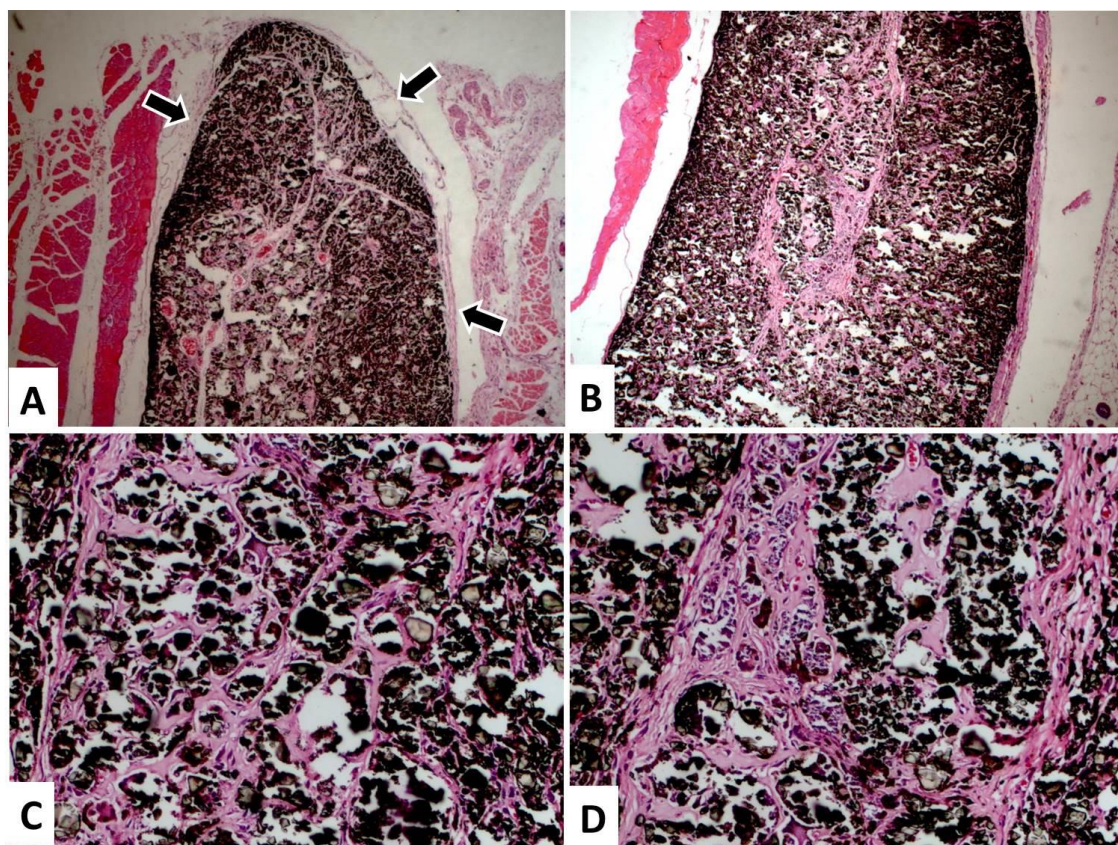


Figura 11- Aspectos histológicos da área do implante subcutâneo de NC_s TiO₂ (8,5nm) em 90 dias. Em (A) observa-se o material implantado aglomerado e bem delimitado por cápsula fibrosa delicada, contornando todo o material implantado (setas). Em (A) e (B) percebe-se a presença de múltiplos septos conjuntivos bem formados entrecortando a área do material implantado, representado por estruturas lineares de diferentes espessuras, eosinófilas (Hematoxilina/eosina, aumento original: 50x). (C) Visão ampliada da região do implante mostrando em detalhe os septos conjuntivos, caracterizados pela presença de tecido conjuntivo denso, não modelado, mas com maior grau de organização que aquele observado aos 15 dias de observação. Algumas áreas a matriz extracelular assume aspecto amorfo, discretamente hialinizado no interior do qual se percebem células fusiformes, ovóides mononucleares, compatíveis com fibroblastos e macrófagos. Em (C) e (D) observamos áreas do implante com a presença de resíduo de nanocristais circunscritos por formações septais de diferentes espessuras constituídas por tecido conjuntivo denso, não modelado (Hematoxilina/eosina, aumento original de 100x).

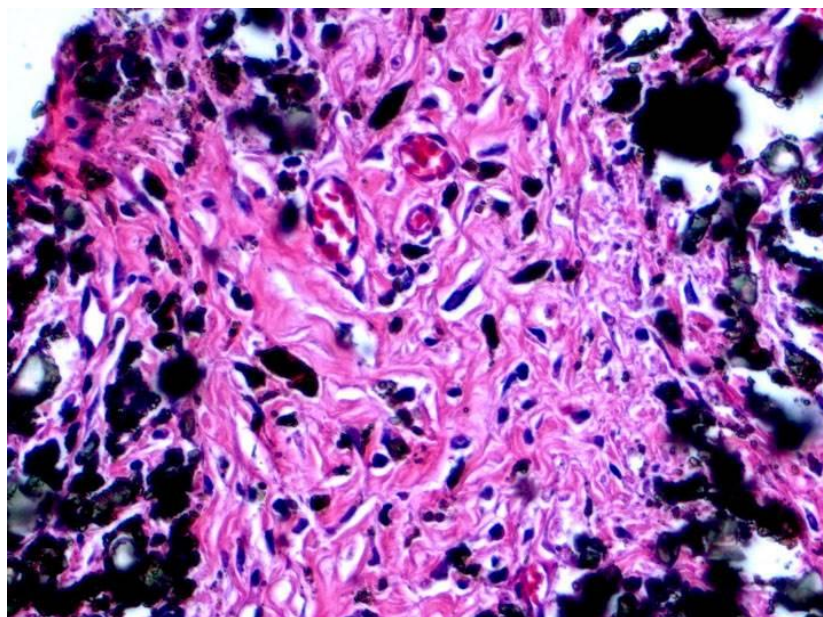


Figura 12 - Detalhe do septo de tecido conjuntivo denso não modelado organizado no interior do implante de NC_s TiO₂ de 90 dias, caracterizado pela presença de componente fibroso permeado por células fusiformes, sugestivas de fibroblatos, e células elípticas carregadas de nanocristais, células redondas menores, provavelmente linfócitos, e vasos sanguíneos capilares apresentando-se hiperêmicos (Hematoxilina/eosina, aumento original: 400x).

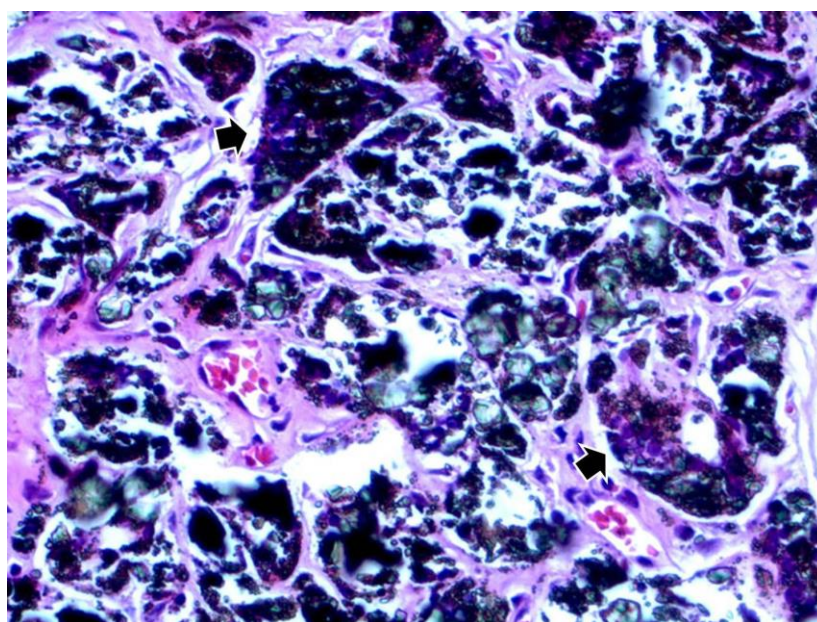


Figura 13 - Presença de células gigantes multinucleadas (setas) associadas à nanocristais de TiO₂ (90 dias)(Hematoxilina/eosina, aumento original: 400x).

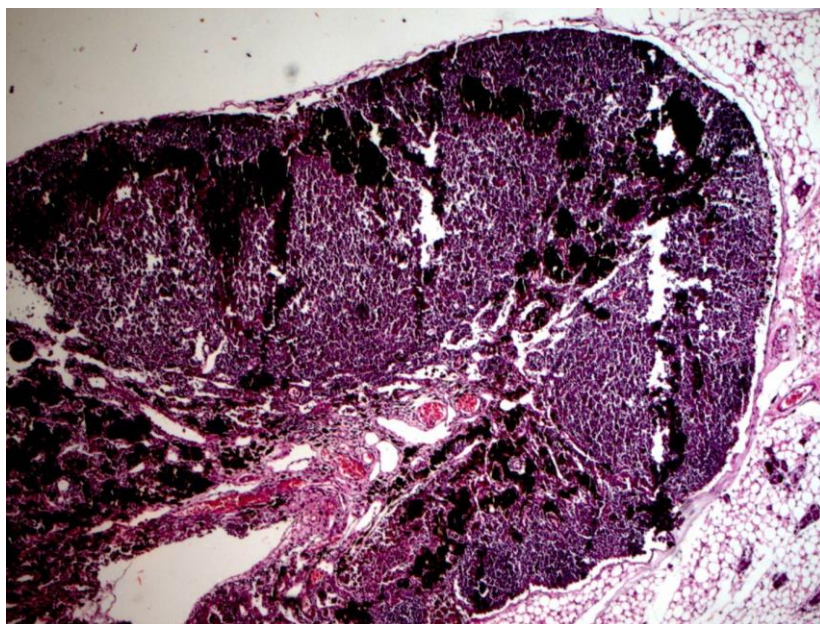


Figura 14 – Em 90 dias, visão panorâmica de linfonodo regional mostrando várias áreas mais escuras correspondente a grumos de nanocristais de TiO_2 em região de seio subcapsular, região cortical, paracortical e nos seios medulares. Estes aglomerados representam especialmente macrófagos carregados de nanocristais. O tecido conjuntivo adiposo perilinfonodal apresenta-se com padrões usuais de normalidade (Hematoxilina/eosina, aumento original: 50x).

5.3.2 – Análise histológica ao MET

As imagens apresentadas na Figura 15 confirmam a internalização dos $\text{NC}_s \text{TiO}_2$ nos macrófagos, no interior de vacúolos fagocitários. As demais, organelas com aumento de volume (dilatadas), típico de células em processo de degeneração celular, caracterizando a presença de degeneração hidrópica. Foram encontradas células em apoptose com o envoltório nuclear disforme, mostrando grumos de cromatina associadas à membrana nuclear (Figura15).

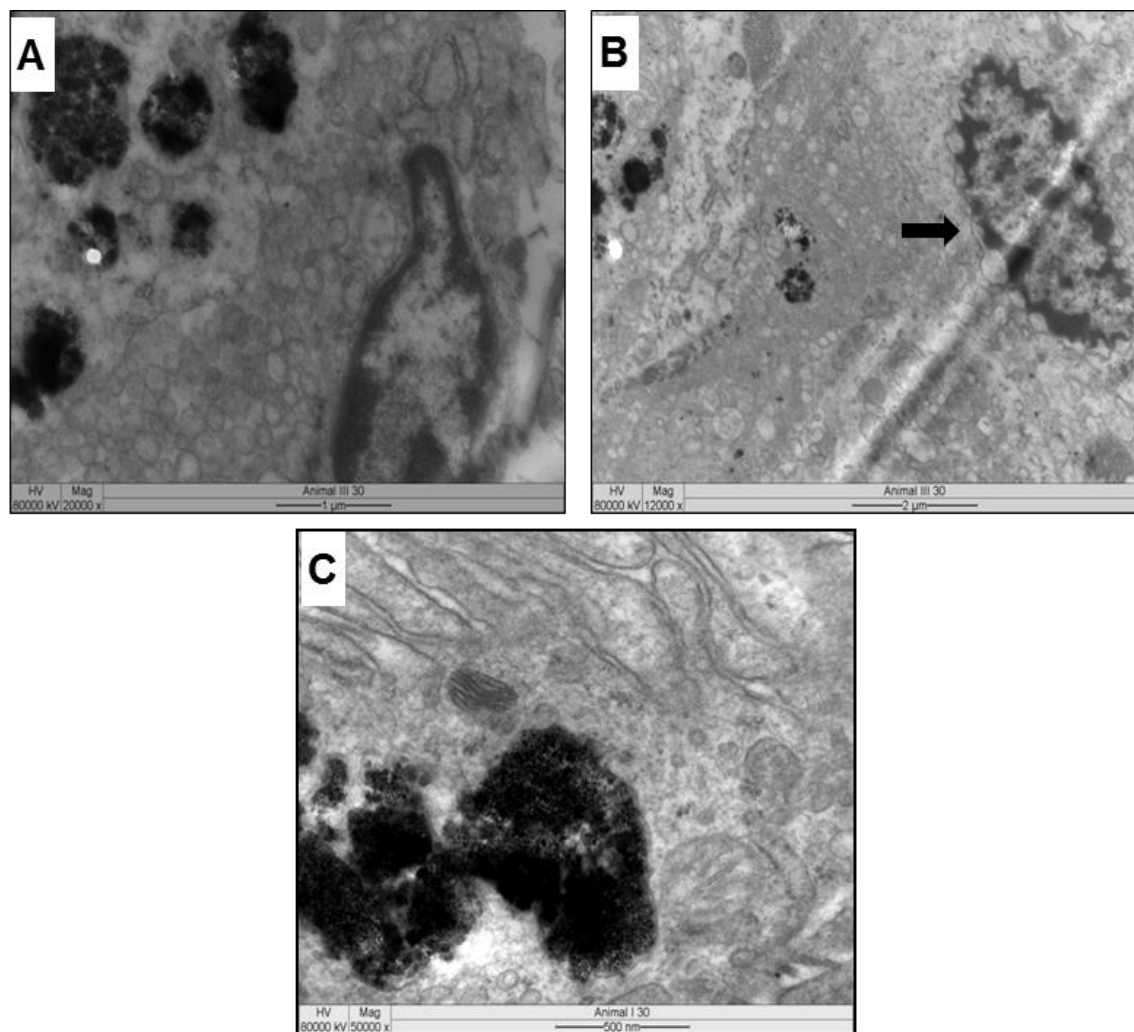


Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão capturadas de tecidos implantados de NC_s TiO₂ no tempo de exposição de 30 dias. Em (A) Organelas com nítida aparência de “inchaço”, evolução do processo de degeneração celular, (B) Membrana nuclear disforme, sinalização de célula apoptótica (seta) e (C) Macrófago com NC_s TiO₂ no interior de vacúolo fagocitário.

5.4 - Teste de Viabilidade Celular- MTT

Uma maior viabilidade celular pode ser observada nas amostras tratadas com as concentrações 10 µg/ml e 20 µg/ml de NC_s TiO₂ em relação às demais amostras. A partir de 40 µg/ml a viabilidade celular diminuiu acentuadamente, mantendo-se em valores abaixo de 20% de células viáveis também para as concentrações de 100 µg/ml e 200 µg/ml (Figura 16).

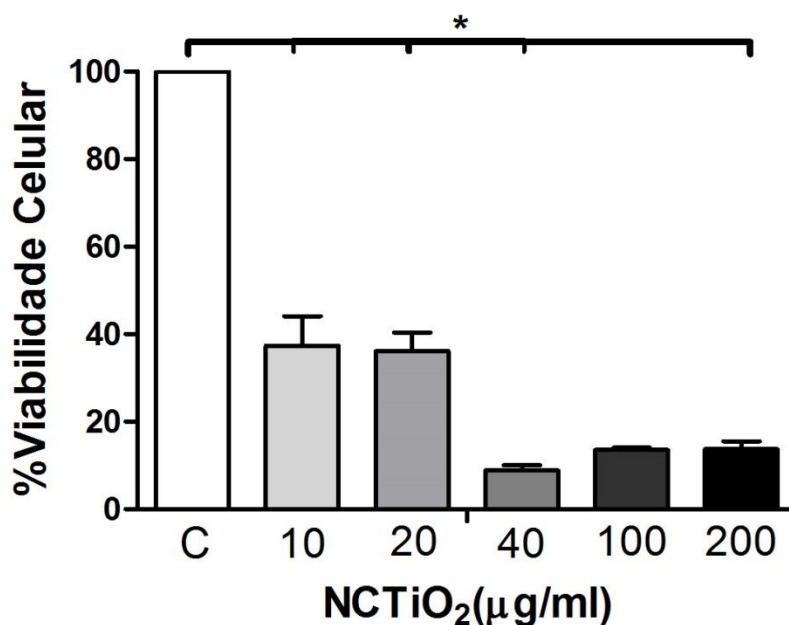


Figura 16 - Viabilidade celular avaliada após 72 horas da cultura celular de macrófagos peritoneais e NC_s TiO₂ em relação ao grupo controle sem tratamento. *P<0,05.

5.5 - Dosagem de citocinas dos tecidos subcutâneos

- TNF-α

O grupo de 15 dias alcançou os maiores níveis de produção em comparação ao controle e aos demais grupos experimentais (30 e 90 dias) que apresentaram níveis bem menores de produção. Houve diferenças significantes estatisticamente entre o grupo controle e o grupo de 15 dias (Figura17A).

- IL-1 β

Em todos os períodos de observação, os níveis de IL-1 β observados foram maiores que aqueles obtidos para o grupo controle. Todavia, maiores níveis foram observados aos 15 dias de observação, sendo encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e os grupos de 15 e 30 dias. Os grupos tratados tiveram uma diminuição na produção de IL-1 β de forma tempo dependente (Figura17 B).

- IL-12

Para IL-12, os níveis observados em todos os tempos experimentais foram mais altos que o do grupo controle. O grupo de 15 dias alcançou níveis significativamente diferentes em relação ao grupo controle e maiores níveis de produção que os grupos de 30 e 90 dias (Figura17 C).

- INF- γ

Em todos os períodos experimentais os níveis de INF- γ foram significativamente superiores aos encontrados para o grupo controle, sendo que os grupos de 15 e 30 dias apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (Figura17 D).

- IL-4

Os níveis de IL-4 foram significativamente maiores em todos os grupos experimentais quando comparados aos níveis do grupo controle. O grupo de 15 dias apresentou valores mais altos na produção de IL-4 em relação aos demais grupos, para os quais os níveis decresceram gradativamente com o tempo (Figura17 E).

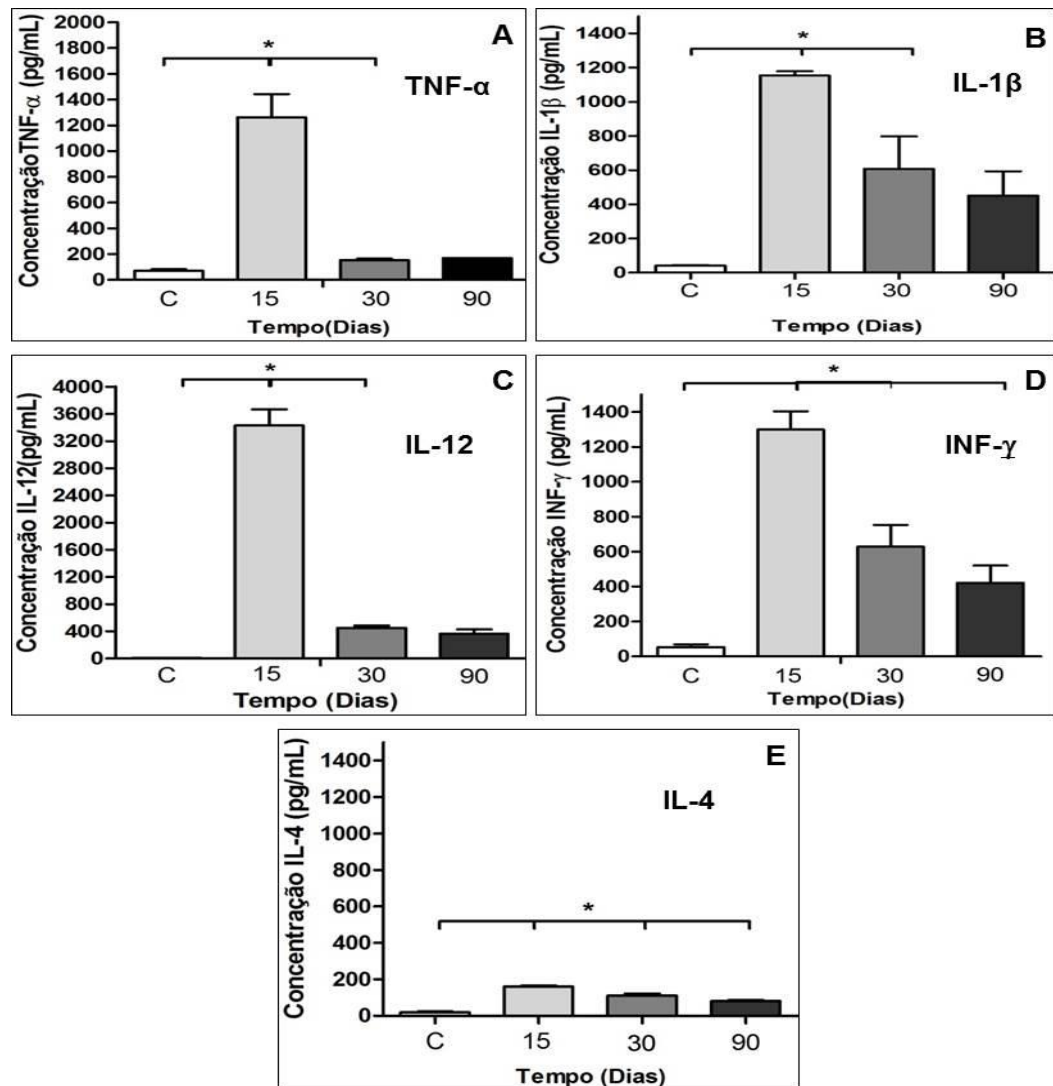


Figura 17- Dosagem de citocinas em tecido subcutâneo de camundongos Balb/c tratados com NC_s TiO₂ (1mg/ml), em **A** (TNF- α), **B**(IL-1 β), **C**(IL-12), **D**(INF- γ), **E** (IL-4). Valores significativamente diferentes *P<0,05.

5.6 - Dosagem de nitrito pela reação de Griess.

Os níveis de nitrito apresentados pelas amostras estão representados na figura 18. Foram feitas comparações entre os níveis de nitrito produzidos pelas amostras de macrófagos peritoneais sob as concentrações de NC_s TiO₂ de 10 µg/ml e 20 µg/ml nos diversos períodos de exposição (2, 12, 24, 72 horas) em relação ao grupo sem tratamento (controle).

Em relação às amostras com concentrações de NC_s TiO₂ 10 µg/ml no primeiro período de exposição de 2 horas apresentou uma maior produção de nitrito em relação às demais concentrações, característica que se manteve nos períodos de 12 e 24 horas, alcançando então nestes períodos diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos controles P<0,05. As amostras de NC_s TiO₂ 20µg/ml tiveram os níveis de produção de nitrito de forma oscilante de forma geral e alcançaram diferença estatística significativa no tempo de 2, 24 e 72 horas (P<0,05) em relação à concentração 10 µg/ml.

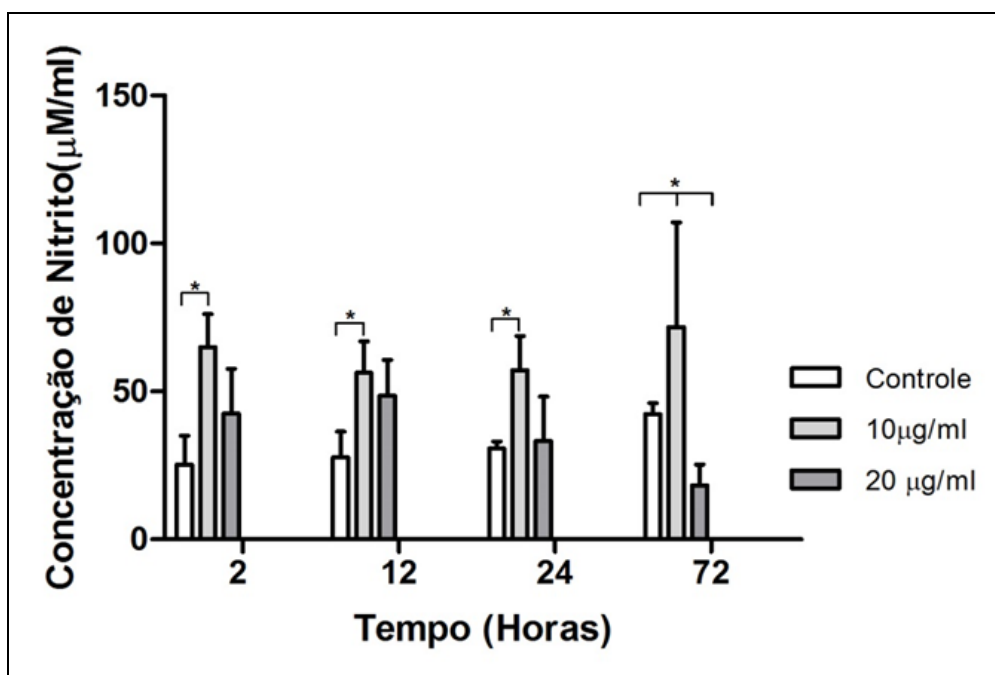


Figura 18- Dosagem de nitrito encontrado em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais submetidos às concentrações de NC_s TiO₂ (10 e 20µg/ml) nos de tempos 2, 12, 24,72 horas.*P<0,05.

5.7- Dosagem das citocinas a partir da cultura de macrófagos peritoneais desafiados por nanocristais de TiO₂

- TNF- α :

Em todos os tempos de exposição analisados, as concentrações das soluções de TiO₂ de 10ug/ml e 20ug/ml induziram alta secreção de TNF α , comparativamente aos respectivos controles. Este fenômeno foi observado nas diferentes concentrações das soluções e nos diferentes tempos de exposição ensaiados. Ocorreu que, embora com diferenças discretas, nos tempos de 2 h e 72 horas de exposição observou-se um decréscimo de produção acompanhando a concentração da solução de NC_s TiO₂, já para os tempos 12 e 24 houve um aumento na produção acompanhando o aumento da concentração de TiO₂ exposta aos macrófagos (Figura 19 A).

- IL-1 β :

As amostras nos tempos experimentais 2, 24 e 72 horas apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos controles. No tempo experimental de 12 horas somente a amostra de 20 μ g/ml alcançou diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle. As amostras que foram tratadas com NC_s TiO₂ na concentração de 10 μ g/ml alcançaram um aumento da produção de IL-1 β com o passar do tempo, com exceção do tempo de 12 horas. Em relação às amostras que foram tratadas com NC_s TiO₂ 20 μ g/ml alcançaram um aumento da produção de IL-1 β nos tempos iniciais de 2, 12 horas e teve um pico de crescimento em 24 horas diminuindo em 72horas (Figura 19 B).

- IL-12:

Os valores observados para produção de IL-12 foram maiores nas diferentes concentrações de NC_s TiO₂ ensaiadas em relação aos grupos controles. Em todos os tempos analisados, a produção de IL-12 nas concentrações de 10µg/ml e 20µg/ml de NC_s TiO₂ apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos respectivos controles (Figura 19 C).

- INF-γ:

Conforme a figura 19 D, as amostras de solução de NC_s TiO₂ nas concentrações de 10µg/ml e 20µg/ml induziram níveis elevados de produção de INF-γ, comparativamente aos respectivos controles, de forma semelhante, com pequenas variações nos tempos analisados. Embora os valores de produção de INF-γ tenham sido semelhantes nas diferentes concentrações, houve um ligeiro decréscimo na produção com o aumento da concentração de NC_s TiO₂ nos tempos de exposição de 2h e 12h, invertendo a tendência para os tempos de 24 e 72 h. Todas as diferenças observadas foram estatisticamente significativas, independentemente dos tempos analisados em relação aos grupos controles.

- IL-4:

Foi possível perceber uma produção de IL-4 acima do encontrado para os controles nas diferentes concentrações estudadas, para os diferentes tempos de exposição dos NC_s TiO₂. Todavia, ficou claro também que na menor concentração (10µg/ml) houve maior produção de IL-4 comparativamente a concentração (20µg/ml). Apenas na concentração de 10 µg/ml houve diferença estatisticamente para os grupos controles em todos os tempos de exposição estudados. Para a concentração de 20µg/ml, esta diferença para com os

controles só foi observada nos tempos de 12 e 24 horas de exposição não sendo significativa para dois e 72 horas de exposição (Figura 19 E).

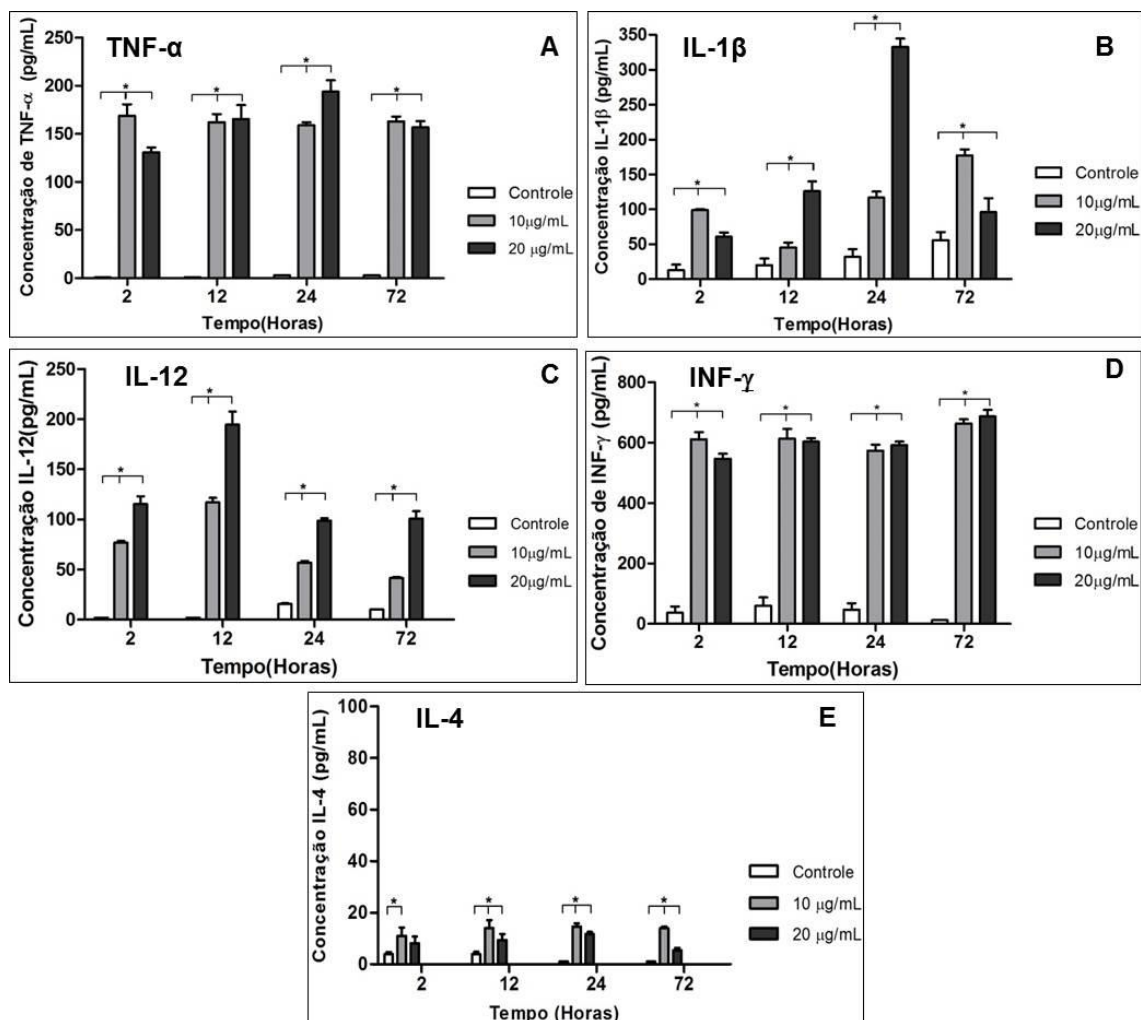


Figura 19 - Dosagem de citocinas em **A** (TNF-α), **B**(IL-1β), **C**(IL-12), **D**(INF-γ), **E** (IL-4). Correlação entre amostras com NC_S TiO₂ (10 e 20μg/ml) e grupo controle.*P<0,05.

6. Discussão

6.1-Síntese e caracterização dos nanocristais de TiO₂

As características dos nanomateriais podem influenciar sua atividade biológica. Geralmente, nanopartículas possuem propriedades físico-químicas dramaticamente diferentes em comparação a macropartículas de mesma composição. Estas diferenças podem refletir na expressão de atividades biológicas avaliadas como positivas e desejáveis (atividade antioxidante, capacidade de suporte terapêutico, penetração por barreiras celulares para carrear drogas) ou negativas e indesejáveis (toxicidade, indução de estresse oxidativo ou disfunção celular) (Oberdörster *et al* 2005).

A literatura apresenta diversos trabalhos nos quais os autores descrevem o nanomaterial pesquisado a partir informações unicamente fornecidas pelo fabricante. Esta postura tem merecido crítica dos grupos tradicionalmente envolvidos em pesquisas com nanomateriais (Wartheit *et al.*, 2008). É frequente a falta de definição sobre as suas propriedades como estrutura (cristal, amorfa), tamanho, pureza, o que tem dificultado a comparação dos resultados obtidos dos trabalhos existentes (Zhang *et al.*, 2012B). Portanto, a caracterização dos nanomateriais se faz necessária para a possível comparação de estudos em nível internacional podendo com isso favorecer discussões confiáveis sobre seus efeitos biológicos (Krug *et al.*, 2011).

Os nanomateriais alvos deste estudo foram nanopartículas de TiO₂. Estas nanopartículas podem ser encontradas em três formas alotrópicas puras, ou seja, três formas diferentes quanto à disposição de seus átomos, a saber: anatase, rutila e brookite, e ainda uma fase mista anatase/rutila. A forma anatase assume uma estrutura cristalina organizada de forma tetragonal, a fase brookite evidenciando organização ortorrômbica, e a fase rutila, que também possui disposição tetragonal. Analisando a distribuição organizacional destas fases pode se caracterizar as nanopartículas como sendo nanocristais

ou amorfas. Para ser denominado como nanocristal de TiO_2 , as nanopartículas de TiO_2 devem possuir a distribuição de sua(s) fase(s) organizadas periodicamente a longo alcance. Caso a distribuição destas fases não ocorra de modo periódico a longo alcance, será então denominada amorfa, ou simplesmente nanopartículas (NP_s). No presente estudo, diferentemente de vários outros encontrados na literatura, em que se utilizam nanopartículas comerciais para os experimentos biológicos, optou-se pela realização do experimento de síntese das nanopartículas de TiO_2 . O nanopó obtido foi sintetizado a partir de um precursor do titânio, o isopropóxido de titânio, do qual se fez a dissociação do íon de titânio dando sequência ao processo previamente descrito (secção de materiais e métodos).

Com o objetivo de se obter respostas sobre as características destas nanopartículas de TiO_2 se realizou testes como DRX e micro Raman, obtendo como resultado a confirmação das seguintes características: nanocristais medindo, em média, 8,5nm, apresentando alto grau de pureza devido ao não surgimento de nenhuma outra nanoestrutura na amostra, mostrando fase estrutural mista, caracterizada pela presença das fases anatase e rutila, em uma de proporção 66% anatase e 34% rutila.

Por meio da análise dos espectros de absorção óptica e fluorescência dos nanocristais, verificou-se que a banda de absorção dos nanocristais de TiO_2 está localizada em comprimentos de onda menores dos encontrados pelo TiO_2 *bulk* ($> 10\text{nm}$) (413,26 nm – rutila e 387,4 nm – anatase). Nos espectros de fluorescência, pode-se observar a presença de três bandas: uma correspondente a transição excitônica, e outras duas que são atribuídas a vacâncias de oxigênio. Isto confirma que as estruturas crescidas foram nanocristais que apresentam efeitos de confinamento quântico (pontos quânticos- PQ_s), favorecendo um perfeito controle de suas propriedades ópticas.

6.2- Biocompatibilidade avaliada pelo experimento *in vivo* de implantes subcutâneo de nanocristais de TiO₂

A busca pela confirmação da biocompatibilidade de nanomateriais ainda abrange vários aspectos como o comportamento biológico de suas propriedades físicas, mecânicas e químicas, como também, seu potencial citotóxico, ou seja, qualquer alteração que possa resultar em prejuízo aos fenômenos fisiológicos normais (Williams, 2008). Do ponto de vista fisiológico, poucos materiais são considerados totalmente inertes, visto que a grande maioria apresenta na sua constituição uma variedade de componentes com potenciais tóxicos ou irritantes (Anusavice, 2004).

A avaliação da biocompatibilidade dos materiais tem sido conduzida em sistemas *in vivo*, a partir da implantação de materiais no tecido conjuntivo subcutâneo de animais de experimentação, bem como por meio de investigações *in vitro*, principalmente a partir de seus efeitos em sistemas de células em cultura. Em ambas as possibilidades, o objetivo é entender como o material interage com o tecido *in loco*, por meio da identificação de fenômenos celulares como a produção de mediadores com efeitos nos constituintes do tecido conjuntivo e no sistema imune propriamente dito. Os alvos desta investigação seriam relacionados, portanto, a modulação e ação efetora no processo inflamatório e reparo (Stanford, 1980).

Neste estudo, procurou-se utilizar uma metodologia direcionada a esta avaliação. Estas metodologias têm sido amplamente empregadas na avaliação da biocompatibilidade de materiais produzidos para emprego em procedimentos odontológicos ambulatoriais ou cirúrgicos. Estes parâmetros têm sido bem discutidos em documentos próprios (FDA, 1980; ANSI/ADA, 1982), e tem sido referência para diferentes autores, incluindo deste grupo, para desenvolvimento de testes de biocompatibilidade. Para que um determinado material possa ser aceito como biocompatível, é necessário que o tecido conjuntivo adjacente ao material estudado revele, ao fim da segunda semana, completa ausência de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, ou um grau mínimo dessas células. Os acontecimentos biológicos envolvidos nas primeiras

horas e na primeira semana são preparatórios e não participam dos critérios e da interpretação dos resultados, enquanto os das demais semanas são determinantes e respondem por eles, embora seja de aceitação geral a interdependência que existe entre um e o outro (Oliveira e Sadigursky, 2008). Se, ao fim da segunda semana, as referidas células estiverem presentes em grau moderado, é necessário que decresçam ao grau mínimo em até doze semanas (Stanford, 1980).

O presente trabalho teve como um de seus objetivos, avaliar aspectos da biocompatibilidade dos NC_s TiO₂, pôde-se perceber que desde os tempos mais precoces dos implantes (15 dias), instalou-se uma resposta inflamatória do tipo granulomatosa inespecífica, intensa. Este processo, a priori, pode ser interpretado como que se restringindo a área do material. Os leucócitos, predominantemente do tipo mononucleares, dominavam o quadro, com prevalência de macrófagos mono e multinucleares, estes do tipo corpo estranho. Estes achados mostraram que os NC_s TiO₂ induzem uma resposta tecidual que transcende aquela decorrente do trauma tecidual no momento da realização do implante. Reforça esta impressão, o fato de que aos 15 dias, nenhuma alteração morfológica resultante do traumatismo pela agulha na injeção de soro fisiológico 0,9% pôde ser observada no controle. Pela análise morfológica tecidual isoladamente, não é possível estabelecer se esta resposta está relacionada ao tipo do NC e/ou sua concentração, já que foi utilizada apenas uma concentração de NC_s TiO₂ no experimento. Todavia, fica bem documentado o fato de que a resposta evoluiu com discreta redução em sua intensidade, constatada em especial aos 90 dias de observação, embora ainda pudéssemos identifica-la como intensa. Por outro lado, pode ser observado um aumento na fibrose tecidual intra-implante. Este achado não foi observado na periferia da área implantada, na qual a cápsula fibrosa presente mostrou-se reduzida em espessura aos 90 dias, quando comparada aos 15 e 30 dias de observação. De forma interessante, pode-se perceber também que os NC_s permearam o tecido muscular, sendo observados em íntima associação aos fibroblastos, mas não na célula muscular. Hemorragia ainda foi possível

identificar mesmo nos períodos mais avançados de observação. Por outro lado, necrose, mínima foi observada apenas nos períodos precoces de observação.

Estudos avaliando respostas do tecido subcutâneo à presença de NC_s TiO₂ ainda são escassos. Todavia, nossos achados são, em parte, convergentes àqueles encontrados por Hansen *et al.* (2006). Estes autores realizaram injeções intramusculares (músculo paravertebral) em ratos Sprague-Dawley (em média 250g) de NC_s TiO₂ comerciais (sem especificação de fase) com dimensões em média de 70nm, na concentração de 0,125mg/kg. Embora a ausência de caracterização adequada dos NC_s comerciais utilizados possa interferir na discussão mais ampla dos resultados, os achados descritos pelos autores foram semelhantes, tendo em vista a presença de infiltrado inflamatório no local após 6 e 12 meses. Histologicamente, todos os locais de implantação dos NC_s revelaram proeminentes granulomas intramuscular do tipo corpo estranho. Macrófagos e células gigantes de corpo estranho envolviam abundantes grânulos negros, que não revelavam birrefringência a luz polarizada. Em poucos casos, foi encontrada moderada fibrose em torno dos granulomas. Estes achados foram observados em uma concentração 10 vezes menor que aquela utilizada em nosso estudo. Isto salienta a importância da partícula por si na indução da resposta tecidual, não descartando a possibilidade da influência de sua concentração nos tecidos ter uma interferência na intensidade do processo inflamatório.

Estas características deletérias dos NC_s tem sido bem documentada por Chen *et al.* (2009). Os autores realizaram um experimento administrando injeções intraperitoneais de nanopartículas sintetizadas e caracterizadas de fase anatase, com média de 80-100nm, em doses variando entre 6,48mg/ml a 51,84mg/ml em camundongos ICR. Após sete dias, os autores identificaram histologicamente sérias complicações nos órgãos analisados como, por exemplo, no fígado, evidenciando fibrose hepática e presença ocasional de células necróticas e corpos apoptóticos. Várias lesões foram observadas no baço dos grupos submetidos às doses mais altas, onde foi evidenciado intenso infiltrado inflamatório neutrofílico. Os túbulos renais se apresentaram dilatados e com a presença de líquidos proteicos. Os pulmões apresentaram

espessamento do septo alveolar, infiltração de alguns neutrófilos no interstício pulmonar e trombose no sistema vascular pulmonar devido ao bloqueio dos vasos sanguíneos após a injeção intraperitoneal.

Nossos resultados mostram um aumento de fibrose intra-implante, embora a espessura da cápsula fibrosa ao implante tenha reduzido no período mais avançado de observação. Este estudo é limitado em relação ao tempo de exposição e não se sabe se esta fibrose tecidual poderia ser remodelada, eliminando assim um potencial efeito deletério de sua presença em longo prazo.

Estes fenômenos, além de refletirem a deleteriedade da presença intratecidual das NCs, seriam também responsáveis pelo desenvolvimento de um ambiente favorável à manutenção da resposta inflamatória. A priori, não se deve negligenciar a própria movimentação tecidual na potencialização da ação agressora das partículas. Micro-traumatismos pelos nanocristais aglutinados em um microssistema fisicamente instável, também devem ser considerados na geração de novos mediadores potencializadores da resposta tecidual. Vale ressaltar que a fibrose, por si, constitui-se em fator favorecedor de alterações disfuncionais em órgãos parenquimatosos, caso ocorressem neles depósitos de NCs, como nos resultados de Chen *et al.* (2009).

A dimensão da partícula utilizada também deve ser considerada na interpretação dos resultados observados. Oberdörster *et al.* (2005) afirmam que quanto menor a partícula, maior será sua área de superfície e a sua reatividade biológica, podendo com isso ter seus efeitos biológicos potencializados. Por outro lado, evidências experimentais indicam que células fagocitárias não interagem com nanocristais propriamente, e sim com seus aglomerados (Oberdörster *et al.* 1992). Nosso estudo mostrou semelhantes aglomerados de dimensões macroscópicas, rodeados de macrófagos e células gigantes multinucleadas formando granulomas, mas com formação de cápsula fibrosa, que poderiam ser consideradas como uma reação típica do tipo granulomatosa de corpo estranho.

Provavelmente, a retenção da resposta inflamatória por prolongado período de estudo também possa estar relacionada à dose podendo produzir

agregados maiores devido a maior superfície de contato, apresentando uma maior interação entre os NC_s dificultando a desaglomeração (Grassian *et al.* 2007). Krug & Wick (2011) defendem que macrófagos sobrecarregados de NC_s favoreceriam biopersistência dos nanocristais dificultando sua remoção do tecido devido à diminuição da capacidade fagocítica de macrófagos ao estarem com seu interior repleto de nanocristais, portanto quanto maior for a dose de exposição à nanocristais menor será sua capacidade fagocítica (Oberdörster *et al.* 1992, 2005; Renwick *et al.*, 2001; Bermudez *et al.*, 2004). Macrófagos passam a apresentar o processo fagocitário com característica mais lenta, permanecendo no local partículas livres, não fagocitadas, podendo estes NC_s ser encontrados em células epiteliais ou no interstício (Grassian *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012A; Shy *et al.*, 2013).

Outro fato interessante foi a identificação dos NC_s nos linfonodos nos diferentes períodos de estudo destacando outra questão importante na dinâmica da resposta tecidual aos NC_s TiO₂: a análise da mobilidade orgânica dos NC_s de TiO₂. Estas informações podem ser obtidas a partir de pesquisas objetivando análises histológicas de órgãos de animais após injeções subcutâneas, intraperitoneal e intravenosa de NC_s sugerindo que estas partículas possam ser carregadas a distância. Patri *et al.* (2009) avaliaram a biodistribuição de nanocristais após três dias de exposição, injetando NCs de TiO₂ em linfonodos inguinais de Balb/c, na dose de 5,6 g/kg por animal, dose esta maior que a utilizada neste estudo. Os nanocristais foram também de fase mista (80% anatase, 20% rutila), embora comerciais (Degussa, Renânia do Norte, Alemanha) e de dimensão em média de 30nm. A biodistribuição foi avaliada por microscopia óptica e encontraram nanocristais no interior de linfonodos, porém não no local das injeções. Os nanocristais se apresentaram como aglomerados de 5 a 15µm associados com células fagocíticas na região hilar subcortical. Estes achados corroboram os já descritos para nosso estudo, mostrando que a via linfática pode ser um canal de disseminação dos NC_s.

Umbreit *et al.* (2011), utilizaram os mesmos tipos de NC_s e também desafiaram camundongos Balb/c através de injeções subcutâneas em linfonodos inguinais, porém por períodos de exposição maiores 15, 30, 90 e

182 dias. Utilizando, desta vez, duas concentrações diferentes (0,056g/kg e 5,6g/kg), os autores avaliaram a biodistribuição dos NC_s em fígado, rim, pulmão, baço e linfonodos. Observaram materiais residuais nos locais das injeções apresentando elementos de reação inflamatória do tipo corpo estranho, e ao longo do tempo, um aumento de fibroblastos no local. Esta reação associada à presença dos aglomerados regrediu lentamente, com a redução do tamanho dos aglomerados nos locais das injeções, sugestivo do mecanismo de drenagem linfática. Os autores creditaram a tendência de formação de aglomerados locais a vários parâmetros ambientais como pH tecidual, temperatura, tipo e grau de carga de superfície. Admitem ser concebível a interação das partículas com células e tecidos, porém vinculados a um estado dinâmico de dissociação e agregação destes aglomerados. Em um determinado momento se tornam mais visíveis ou não, dependendo do microambiente tecidual e das características das partículas. Ao longo do tempo esta interação pode ser estabilizada favorecendo a persistência destes aglomerados. Nossos resultados são compatíveis com as observações descritas anteriormente, especialmente identificados nos linfonodos examinados próximos à região do implante. Ficou também evidente que este fenômeno não se deu por invasão direta dos linfonodos pelo processo inflamatório, mas provavelmente, pelo seu transporte via vasos linfáticos, aparentemente como depósitos intracelulares. Esta dinâmica é extremamente importante na avaliação do potencial tóxico destas partículas, não relacionados ao seu potencial imunogênico e antigênico. Trata-se da possibilidade de sua deposição a partir do rompimento de macrófagos e a criação de depósitos secundários também favorecendo a indução de fenômenos inflamatório-reparadores, com potencial implicação na disfunção do órgão (Chen *et al.*, 2009; Patri *et al.*, 2009; Umbreit *et al.*, 2011).

Aparentemente, apenas a presença dos NC_s em contato com o meio interno por deposição local poderia justificar esta disseminação. Todavia, Grassian *et al.* (2007) não identificaram nenhuma anormalidade patológica nos tecidos pulmonares desafiando camundongos C57Bl/6 a partir da inalação de NC_s TiO₂. Mais estudos, portanto, seriam necessários para verificar

especificamente esta via de disseminação dos NC_s no organismo desafiado, especialmente quando os organismos são desafiados de forma não invasiva pelos NC_s TiO₂. Mesmo assim, seria importante verificar se isto não poderia ocorrer como um fenômeno tardio.

Resultados divergentes como, por exemplo, os Oberdörster *et al.*(2002) mostram que NC_s de TiO₂ (26nm) foram translocados para o fígado 24 após sua inalação. Estes achados reforçam também a evidência de que os NC_s provocam respostas biológicas diferentes, que são em parte vinculados ao tipo de tecido desafiado (Xie *et al.*2011; Shy *et al.*2013).

Resultados obtidos pela microscopia eletrônica no presente estudo evidenciaram as observações obtidas anteriormente pela microscopia óptica que foram sinais de apoptose e necrose. Semelhante achado foi visto por Borm *et al.*(2004) que mostraram imagem de NC_s, anatase no interior de macrófagos alveolares de ratos após uma única inalação, que persistiu por dois anos. Patri *et al.*(2009) evidenciaram por microscopia eletrônica agregados escuros intracelulares, principalmente nas células de Kupffer. Em outras imagens evidenciaram que os aglomerados estavam no interior de vacúolos (lisossomos secundários) destas células. Camundongos que ingeriram por 60 dias solução contendo NC_s TiO₂ (7nm) em concentrações de 5, 10, 50mg/kg, fase anatase, apresentaram discreto crescimento (vacuolização) mitocondrial em hepatócitos e células apoptóticas.

6.3- Avaliação da viabilidade celular

O sistema imunológico apresenta em sua composição barreiras físicas e químicas que são consideradas a linha de defesa inicial contra os microrganismos. Se estas barreiras forem “invadidas” tal sistema distingue células e moléculas que pertencem ao corpo, ou seja, “próprias” daquelas que não pertencem “não próprias”, utilizando os sistemas imunes inato e adaptativo

na construção de resposta com finalidade de eliminar agressores e a remoção de tecidos danificados, mantendo assim a homeostasia (Doan, 2009).

O sistema imunológico inato atua com mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a infecções. Este sistema age apenas a microrganismos (não apresenta respostas contra substâncias não infecciosas) sendo sua resposta basicamente a mesma a sucessivas infecções. O sistema imunológico adaptativo atua à medida que a capacidade defensiva e a amplitude da resposta aumentam devido a exposições posteriores, podendo reagir a várias substâncias microbianas ou não, possui “memória” e tem como componentes linfócitos e seus produtos (Doan, 2009). Deve-se considerar que a resposta imune inata estimula a resposta imune adaptativa e pode influenciar a natureza de suas respostas, porém de forma harmônica a resposta adquirida utiliza dos mecanismos efetores da imunidade inata na eliminação de microrganismos e, por várias vezes, potencializa as atividades antimicrobianas da imunidade inata (Abbas, 2005; Bilate *et al* 2007; Doan, 2008; Schanem *et al*, 2009).

Macrófagos são células fagocitárias que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear e são componentes do sistema imunológico natural. Eles atuam fisiologicamente na defesa contra microrganismos infecciosos, participando também no desencadeamento de resposta imunológica na interação com substâncias estranhas não infecciosas (Doan, 2009). Originam-se na medula óssea, circulam no sangue, amadurecendo progressivamente, tornando-se ativos no ambiente tecidual (Abbas, 2008). Estas células são classificadas em três grupos funcionais: 1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem estímulo prévio; 2) macrófagos elicitados, recrutados para a cavidade peritoneal como resposta a um agente inflamatório não-específico, como por exemplo, agentes químicos (tioglicolato de sódio), que foram utilizados neste estudo e 3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção como por *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), o qual produz um exsudato rico em citocinas (Cohn, 1984).

Neste estudo, utilizou-se macrófagos peritoneais de camundongos, por se tratar de células de cultura primária e que poderiam responder às nanopartículas de forma mais semelhante ao que ocorreria *in vivo*. Em contrapartida, diversos trabalhos na literatura fazem uso de células imortalizadas como macrófagos J 744.3, macrófagos alveolares de ratos (NR8383) e RAW 264,7 (Barlow *et al.*, 2010; Sohaebuddin *et al.*, 2010; Scherbart *et al.* 2011). Alguns autores, como Scherbart *et al.* (2011), afirmam que células de linhagem trazem algumas limitações e sugerem que seus próprios experimentos fossem refeitos, preferencialmente com macrófagos primários.

Macrófagos peritoneais foram avaliados quanto sua viabilidade após desafio com NC_s TiO₂, com o objetivo de determinar as concentrações limítrofes em que os NC_s TiO₂ não seriam prejudiciais (Zangh *et al.* 2012A). Utilizou-se o método colorimétrico do MTT, que avalia a capacidade das células metabolicamente ativas em reduzirem, por ação da succinato desidrogenase mitocondrial, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio (MTT).

Foram testados inicialmente cinco concentrações de NC_s TiO₂ (10, 20, 40, 100 e 200 µg/ml) em cultura celular e foram encontrados resultados de comportamento dose-dependente. Exceção à amostra na concentração de 40µg/ml que fugiu de uma tendência de diminuição da viabilidade celular em relação ao aumento da concentração de nanocristais nas amostras. Não foi possível encontrar uma explicação biológica para este resultado. Assim, seria importante considerar a possibilidade de um erro técnico experimental, visto que as demais concentrações (10, 20, 100 e 200 µg/ml) seguiram a tendência mencionada.

No presente estudo, a identificação de reduzida viabilidade celular frente aos NC_s a partir de observações *in vitro*, já observada nas primeiras horas de desafio, reforçam a potencial toxicidade do material implantado. Nossos achados mostram que macrófagos em cultura expostos a doses bem menores que as implantadas no dorso do animal (10µg/ml e 20µg/ml) tiveram sua viabilidade reduzida a aproximadamente 50% em 72 horas. Estes dados demonstram o potencial tóxico da NC_s TiO₂ nestas concentrações, por

mecanismos que, provavelmente, não estão vinculados a suas propriedades físicas relacionadas à dimensão e agregação no sistema líquido.

Não foi possível encontrar estudos de viabilidade celular a partir de culturas com macrófagos peritoneais de camundongos. Todavia, destacamos, a seguir, alguns resultados semelhantes, como por exemplo, diversos autores tem testado NC_s TiO₂ de diversas procedências (Sun Innovations, Canadá; Degussa, Renânia do Norte, Alemanha; TAL Materials Incorporation, USA Sigma Aldrich Saint Louis, Missouri, USA Altair Nanomaterials Incorporation, Reno, Nevada, USA Evonik Degussa Korea Ltda, Incheon, South Korea, Sigma Aldrich, St. Quentin, Fallavier, França), variadas dimensões (5, 10, 15, 18, 22, 38, 50, 53, 70, 100nm), formas estruturais (anatase, rutila, anatase/rutila (mista)), em diversas concentrações (1, 10, 12,5, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 125, 5, 200, 400, 600, 1000 µg/ml) em vários tipos celulares (células epiteliais brônquicas (BEAS-2B), IP15 e HK-2 (ambas as células renais humanas), macrófagos RAW 264.7, macrófagos alveolares de ratos (NR8383), macrófagos murinos Ana-I e MH-S, células dérmicas epiteliais humanas (HDMEC), A549(células epiteliais alveolares humanas), IP15(células renais humanas) e também por diversos tempos de exposição (24, 48 e 72 horas) observando uma clara queda na viabilidade celular que varia proporcionalmente à concentração utilizada (Gurr *et al.* 2005; Hussain *et al.* 2005; Dechsakulthorn *et al.* 2007; Park *et al.* 2008; Liu *et al.*, 2010; Sohaebuddin *et al.* 2010; Pujalté *et al.*, 2011; Scherbart *et al.* 2011; Zhang *et al.* (2012B)).

Todavia, resultados divergentes também têm sido produzidos por alguns autores Renwick *et al.*(2001), Peters *et al.*(2004), Monteiller *et al.*(2007), L'Azou *et al.* (2008), Hsiao *et al.*(2011) que também desafiaram diversos tipos celulares (células dérmicas epiteliais humanas (HDMEC), A549(células epiteliais alveolares humanas), IP15(células renais humanas) de diversos fornecedores (Sigma Aldrich, St. Quentin, Fallavier, França, Degussa, Renânia do Norte, Alemanha), de dimensões variadas (15, 18, 22, 38, 50, 53, 70nm), em diversas concentrações (0,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 160 µg/ml) em tempos

diversificados (24, 48,72 horas) e também em todas as formas estruturais (anatase, rutila, anatase/rutila (mista)).

Vários foram os tipos celulares avaliados, várias nanopartículas de fases e tamanho variados, diversos são os resultados, a literatura afirma que uma mesma nanopartícula exerce efeitos diferentes em células diferentes ou em espécies diferentes (Bermudez *et al.*, 2004). É importante ressaltar que grande parte dos trabalhos citados não possui descrição adequada dos NCs empregados, boa parte utilizando produtos comerciais, sem o preciso controle de forma e tamanho dos nanocristais.

No presente trabalho, a diminuição considerável da viabilidade celular (<20% de células viáveis) observada para as culturas submetidas às concentrações de 40, 100 e 200 µg/ml orientou-nos pela não utilização das mesmas para a avaliação da produção de citocinas e NO.

6.4- Produção de nitrito

Os macrófagos após fagocitarem um corpo estranho, os aprisionam nos fagossomas. Os macrófagos então aumentam de tamanho, ocorrendo a fusão dos fagossomas e lisossomas, gerando fagolisossomas. A partir daí, com o objetivo de destruir e degradar o material ingerido utilizam de mecanismos como a elevação da captação de oxigênio, conhecida como explosão oxidativa e com produção de óxido nítrico (NO) (Doan, 2008).

O óxido nítrico é um gás extremamente instável e com uma meia vida de poucos segundos. É um mediador químico do processo inflamatório, podendo agir de forma multifuncional, como neurotransmissor e como um vasodilatador. É importante na resposta imune inata como importante molécula citotóxica. Suas funções são complexas e antagônicas, podendo ser benéficas ou potencialmente tóxicas conforme a concentração, dependendo também de sua depuração tecidual (Doan, 2008). A liberação de óxido nítrico leva a uma cascata que gera sérios danos celulares, necrose e inflamação.

Sua mensuração é possível através de produtos estáveis de sua decomposição, o nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-) (Queiroz e Batista, 1999; Filho e Ziberstein, 2000; Cerqueira e Yoshida, 2002). Dessa forma foi realizado o experimento de dosagem de nitrito com o sobrenadante das amostras submetidas aos NC_sTiO_2 nas concentrações selecionadas (10 $\mu\text{g/ml}$ e 20 $\mu\text{g/ml}$) e nos tempos de 2, 12, 24 e 72 horas. Para as amostras que foram submetidas à NC_sTiO_2 em 10 $\mu\text{g/ml}$, houve uma tendência a aumento nos níveis de nitrito de forma tempo dependente, sendo alcançado um valor acima de 50 $\mu\text{M/l}$ nas primeiras duas horas, oscilando em 12 e 24 horas e tendo um pico na produção em 72 horas. Em relação às amostras com NC_sTiO_2 em 20 $\mu\text{g/ml}$ houve em geral uma produção de nitrito menor que as amostras de 10 $\mu\text{g/ml}$ em todos os tempos de exposição. No tempo de 12 horas teve uma produção um pouco mais expressiva, porém ao longo dos tempos restantes 24 e 72 horas sofreu em decréscimo até alcançar o menor nível 72horas.

O resultado encontrado em nosso estudo se assemelha ao encontrado por Nurkiewicz *et al.* (2009), que ao testarem em sobrenadantes de células musculares espinotrapezoidais de ratos Sprague-Dawley submetidos à inalação de dois tipos de partículas finas (5 μm a 1,5-16 mg/m^3 ou 8-90 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma Aldrich-Saint Louis, Missouri, USA) rutila, e nano (21nm a 6 mg/m^3 ou 4-38 $\mu\text{g/ml}$) (Degussa, New Jersey, USA) mistas (80%anatase e 20%rutila). Neste estudo, as maiores concentrações de partículas produziram menores níveis de produção de nitrito. Todavia, as nanopartículas produziram menos nitritos que as finas, indicando que a redução à escala nanométrica induz uma menor resposta celular.

Há divergências nos resultados de produção de óxido nítrico mediante a utilização de diferentes fases de nanocristais de TiO_2 , por exemplo,

Gurr *et al.*(2005) que desafiaram células epiteliais brônquicas (BEAS-2B) a nanopartículas TiO_2 de diversos tamanhos 10, 20, 200 e > 200nm na fase anatase e 200nm na fase rutila (Sigma Aldrich, Saint Luis, França) a uma única concentração 10 $\mu\text{g/ml}$ por um único tempo de 2 horas e a produção de nitrito foi maior para as nanopartículas de fase anatase de tamanho 20nm. Mikkelsen *et al.*(2011) avaliaram a produção de NO por células endoteliais

venosas umbilicais humanas (HUVECs) submetidas às nanopartículas rutila (21,6nm) e anatase (12nm). Utilizando quatro concentrações (0,1, 10, 50 e 100µg/ml), os autores observaram aumento na produção de óxido nítrico de forma dose-dependente, em que as nanopartículas rutila tiveram uma maior produção em relação às nanopartículas anatase.

Na literatura, as principais fases de cristalinidade de TiO₂, anatase e rutila, se diferenciam em toxicidade pela estrutura cristalina e propriedades de superfície. A fase anatase é reconhecida por diversos trabalhos como sendo mais citotóxica em relação a rutila, desta forma: anatase > anatase/rutila > rutila (Sayes *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2010, Ryabchikova *et al.*, 2010, Shy *et al.*, 2013). No estudo de Nurkiewicz *et al.* (2009), assim como o nosso, foram utilizados nanocristais de forma estrutural mista, com diferença na proporção de anatase e rutila, sendo os nanocristais de Nurkiewicz com maior porcentagem de anatase (80%) em relação ao nosso trabalho (66%). Estas afirmações poderiam justificar os resultados encontrados.

6.5- Perfil inflamatório do experimento *in vivo*

Ao se dosar os níveis das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-12, INF-γ e IL-4 encontradas no sobrenadante do tecido subcutâneo de camundongos submetidos a implantes dorsais de NC_s de TiO₂ nos períodos de 15, 30 e 90 dias pode-se observar uma acentuada produção destas citocinas pelo grupo de 15 dias que foi decrescendo de forma tempo dependente, colaborando com os achados *in vivo* que demonstraram uma intensa inflamação inicial com tendência à diminuição ao longo do tempo.

6.6-Perfil inflamatório *in vitro*

Ainda em relação aos mediadores liberados por macrófagos desafiados nanocristais, as citocinas assumem fundamental papel, visto serem importantes mediadores de processos inatos e adaptativos da resposta imune. As citocinas enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Agem em diferentes tipos celulares podendo diferentes citocinas exercer as mesmas funções. Incluem as interleucinas (IL) e os interferons (INF). As interleucinas constituem, portanto, um grupo de proteínas diferentes, com origens diversas, a maioria em células T, atuando em células-alvo e com efeitos específicos sobre cada alvo. São identificadas por números: IL-1, IL-4, por exemplo, (Doan, 2008).

Entre as várias citocinas que participam da defesa, tem sido dado destaque às citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1. Elas aumentam a expressão das moléculas de adesão, facilitando a passagem de células do vaso sanguíneo para o sítio de infecção, e também estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem NO e a destruírem bactérias.

Outras citocinas produzidas nas fases iniciais da infecção interferem na resposta imune adaptativa. A IL-12, produzida tem papel importante na diferenciação de células Th0 para Th1, adicionalmente, possui participação importante estimulando as células NK (do inglês: natural killer, traduzido como matadoras naturais) a exercer citotoxicidade e a produzir mais IFN- γ , que por sua vez aumenta o potencial microbida dos macrófagos. A citocina IL-4, produzida por basófilos, mastócitos e macrófagos, estimula a diferenciação de células Th0 para Th2 e antagoniza os efeitos ativadores do IFN- γ sobre os macrófagos (Machado et al. 2004).

No presente trabalho foram dosadas as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ e IL-4 encontradas no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais tratados com NC_sTiO₂ nas concentrações de 10 e 20 μ g/ml, nos tempos de 2, 12, 24 e 72 horas.

Avaliando os resultados da dosagem de TNF- α pode se observar uma resposta significativa na produção desta citocina indicando que os NC_s TiO₂ foram capazes de ativar os macrófagos peritoneais nas duas concentrações de NC_s TiO₂ testadas. A citocina TNF- α atua induzindo a produção de IL-1 β , mas não houve uma forte expressão desta citocina nas concentrações selecionadas. A produção de IL-4 foi menor do que as demais citocinas, possui característica anti-inflamatória, porém não foi evidente sua ação inibitória na produção de INF- γ . Através do INF- γ houve uma provável ativação de macrófagos e um aumento na produção de IL-12. Ainda observando o comportamento da produção de citocina TNF- α em relação à concentração NC_s TiO₂ 10 μ g/ml se percebe uma tendência a uma estabilidade, todavia em relação a NC_sTiO₂ 20 μ g/ml houve oscilação nos níveis alcançados. Não ficou evidente uma tendência a dose ou tempo dependente como são apresentados os resultados por Chen *et al.* (2006) que testando NC_s TiO₂ 20nm, fase rutila em macrófagos alveolares, observaram aumento expressivo na produção de TNF- α .

Scherbard *et al.* (2011) observaram que nanopartículas de fase mista (80%anatase e 20%rutila) de 25nm induziram aumento na produção de TNF- α de forma dose dependente, porém não induziram aumento de IL-1 β . Cui *et al.* (2010) avaliando NC_sTiO₂ 5nm, fase anatase, em macrófagos alveolares observaram evidente aumento em TNF- α e IL-1 β , de forma dose dependente, porém uma diminuição dos níveis de IL-4.

Os autores supracitados discutem que não tem sido possível evidenciar nas nanopartículas algum fator que possa justificar o aumento na expressão da produção de citocinas, pois são várias as partículas testadas de diversos fabricantes, de diversas fases e tamanhos para se chegar a uma resposta conclusiva sobre o que causaria este evento.

Como citado anteriormente, a dificuldade em discutir os resultados também esbarram na diversidade de metodologias empregadas, em estudos *in vitro* e *in vivo*, cujos resultados mostram-se conflitantes e, por vezes, incoerentes (Chang *et al.* 2012; Shy *et al.* 2013). Muito embora a razão desses resultados divergentes ainda não ser clara, talvez uma possível explicação seja

a diversidade de tipos celulares testados, diferentes tempos de exposição, estruturas cristalinas variadas sem sua detalhada caracterização e inúmeros tamanhos de nanopartículas analisados. Estes aspectos denotam falta de padronização dos ensaios neste campo de pesquisa, o que dificulta uma real avaliação de biocompatibilidade destes nanomateriais. É consenso na literatura que ainda não há estabelecido um único fator físico-químico característico de nanopartículas isolado que possa receber a atribuição de citotoxicidade, conhecer a associação dessas características é o grande desafio (Oberdörster *et al.*, 2005; Jonhston *et al.* 2009; Ryabchikova *et al.* 2010; Kroll *et al.* 2011; Valant *et al.*, 2012; Zangh *et al.*, 2012A; Chang *et al.*, 2013; Shy *et al.*, 2013).

O fator tamanho foi considerado por muito tempo como o principal fator citotóxico, pois, segundo a literatura, quanto menor a partícula maior será sua área de superfície e, portanto, sua atividade biológica será diretamente proporcional à dimensão de sua área (Oberdörster *et al.*, 2005).

No presente estudo, os nanocristais sintetizados foram de dimensão de 8,5nm, com características ópticas que os definem como pontos quânticos de TiO₂, porém os resultados encontrados não diferem de forma significativa dos demais resultados encontrados na literatura para os testes que foram utilizados, mostrando realmente que não há um fator isolado, como o tamanho, por exemplo, que poderia explicar os achados de citotoxicidade, seria o conjunto de fatores responsável.

A literatura sugere que haja uma padronização dos testes empregados para nanomateriais, com utilização de metodologias e testes biológicos próprios para utilização neste tipo de materiais. Padronização de doses, mais próximas da realidade utilizada em seres humanos. Tempos experimentais maiores, utilização *in vivo*, obedecendo aos critérios dos comitês de ética, porém, não deixando de realizá-los (Rocco *et al.* 2011; Krug *et al.* 2011; Xie *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012),

Mediante aos resultados obtidos nesta pesquisa seria pertinente a investigação dos nanocristais sob diferentes situações. A literatura aponta a necessidade de se analisar a resposta citotóxica *in vivo* em longo prazo e em doses mais condizentes com as doses utilizadas em humanos (Krug & Wick, 2011; Chang *et al.*, 2013). Investigar o mecanismo de biodistribuição dos nanocristais através da alteração de vias de administração, considerando que foram identificados nanocristais no interior de linfonodos. Seria interessante a realização de testes *in vitro* destes NC_s a partir de concentrações menores, frente aos efeitos tóxicos observados com as concentrações utilizadas no presente estudo. Devido à escassez de estudos de nanocristais com células primárias, os resultados desta pesquisa poderiam ser aproveitados para serem confrontados com resultados obtidos de novos testes com estes nanocristais realizados em células de linhagens, avaliando o comportamento destes nanocristais nestes tipos de células. Aprofundar as investigações sobre o mecanismo de internalização celular através de microscopia eletrônica utilizando os dois tipos celulares primários e de linhagem e confrontando seus resultados.

Enfim, muitas são as perguntas e muitas as respostas que sugerem este tema. Segundo Oberdörster *et al.*, 2005, a nanotecnologia está ainda em sua infância.

7 - CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais do presente estudo, nossos os resultados obtidos permitem assinalar as seguintes conclusões:

- O processo de síntese utilizado foi adequado à produção de NC_s de TiO₂ de fase mista (anatase/rutila) de alto grau de pureza com dimensões aproximadas de 8,5 em média e efeitos de confinamento quântico.
- As concentrações empregadas de NC_s TiO₂ em culturas primárias de macrófagos peritoneais se revelaram como citotóxicas, através da diminuição da viabilidade celular e aumento da produção de óxido nítrico. Efeitos pró-inflamatórios foram evidenciados por meio de liberação significativa de citocinas pró-inflamatórias *in loco* e *in vitro*.
- Nas mencionadas condições experimentais os NC_s TiO₂ não são considerados biocompatíveis.

REFERÊNCIAS

Afaq F, Abidi P, Martin R e Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. **Journal of Applied Toxicology**. 1998 Mar; 18: 307-312.

Almeida R J. Síntese e caracterização de nanocristais de TiO₂. **Avaliação de sua biocompatibilidade através de implantes intraósseos**. [dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/ UFU; 2011.

Barlow P G, Baker A C, Donaldson K, MacCallum J, Stone V. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages. **Particle and Fiber Toxicology**. 2005 Dec; 2(11): 1-14.

Bermudez E, Mangum J B, Wong B A, Asgharian B, Hext P M, Warheit D B *et al*. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. **Toxicological Sciences**. 2004 Oct; 77: 347-357.

Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga A G, Reichel C A *et al*. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. **Particle and Fiber Toxicology**. 2008 Nov; 5: 1-14.

Bilate A M B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**. 2007 Junho; 8 (2): 47-51.

Biological Evaluation of Dental Materials. **American Dental Association**, New York, document nº 41.

Bradley J. Nanotech's evolving environmental health, and safety landscape. **Lux Research**. 2010; 1-32.

Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido Nítrico, revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2002 Out; 17(6): 417-423.

Chang X, Zhang Y, Tang M, Wang B. Health effects of exposure to nano-TiO₂: a meta-analysis of experimental studies. **Nanoscale Research Letters**. 2013 Jan; 8: 51.

Chen J, Dong X, Zhao J e Tang G. *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. **Journal Applied Toxicology**. 2008 Jan; 29: 330-337.

Cui Y, Liu H, Zhou M, Duan Y, Li N, Gong X *et al.* Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO₂ nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research A**. 2011 Jan; 96(1):221-229.

Dantas NO, Damigo L, Qu F, Cunha JFR, Silva RS, Miranda KL *et al.* Raman investigation of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals synthesized by precipitation method. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 2008 Nov; 42: 4827-4829.

Dantas NO, Damigo L, Qua F, Silva RS, Sartoratto PPC, Miranda KL *et al.* Structural and magnetic properties of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 2008 Apr; 44: 4727-4729.

Dechsakulthorn F, Hayes A, Bakand S, Joeng L, Winder C. In vitro cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. **Alternative to animal testing and experimentation**. 2008 Aug; 397-400.

Doak S H, Griffiths S M, Manshian B, Singh N, Williams P M, Brown A P *et al.* **Mutagenesis**. 2009 Apr; 24: 285-293.

EPA- United States Environmental Protection Agency. State of the science literature review: nano titanium dioxide environmental matters. 2010 Aug.

Fabian E, Landiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Ravenzwaay B V. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticle in rats. **Archives of Toxicology**. 2008 Nov; 82: 151-157.

Filho R F, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica do Brasil**. 2000; 46(3): 265-271.

Gatti A M, Kirkpatrick J, Gambarelli A, Capitani F, Hansen T, Eloy R *et al.* ESEM evaluations of muscle/nanoparticle interface in rat model. **Journal Mater Science: Mater Med**. 2008 Feb; 19: 1515-1522.

Geiser M, Casaulta M, Kupferschmed B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. **American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology**. 2009 Oct; 38: 371-376.

Grassian V H, O'Shaughnessy P T, Adamcakova-Dodd A, Pettibone J M e Thorne P S. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. **Environmental Health Perspectives**. 2007 Mar; 115: 397-402.

Green L C, Wagner D A, Glogowski J, Skipper P L, Wishnok J S e Tannenbaum S R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. 1982 Feb; 126: 131-138.

Gurr J R, Wang A S S, Chen C H, Jan K Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicology**. 2005 Feb; 213:66-73.

Hoet P H M, Bröske-Hohlfeld I e Salata O V. Nanoparticles-known an unknow health risks. **Journal of Nanobiotechnology**. 2004 Dec; 2: 1-15.

Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. **Chemical Research in Toxicology**. 2012; 25: 605-619.

Hsiao I-L, Huang Y-J. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. **Science of The Total Environment**. 2011 Jan; 409:1219-1228.

Hussain S M, Hess K L, Gearhart J M, Geiss K T, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicology in Vitro**. 2005 Aug; 19: 975-983.

Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen L C J, Martens J. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount .**Toxicology**. 2009 Apr; 260: 142-149.

Jin C, Tang Y, Yang F G, Li X L, Xu S, Fan Y *et al.* Cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. **Biological Trace Element Research**. 2011 May; 141:3-15.

Johnson J H, Hutchison R G, Christensen M F, Peters S, Hankin S, Stone V. Identification of mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. **Particle and Fiber Toxicology**. 2009 Dec; (6): 1-27.

Kroll A, Pillukat M H, Hahn D, Schnekenburger. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 2009 Aug; 72: 370-377.

Krug H F e Wick P. Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. **Angewandte Chemie International Edition**. 2011; 50: 1260-1278.

L'Azou B, Jorly J, On D, Sellier E, Moisan F, Fleury J *et al.* In vitro effects of nanoparticles on renal cells. **Particle and Fiber Toxicology**. 2008 Dec; 5: 22.

Leijh P C J, Zwet T L V, Kuile M N T, Furth R V. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**. 1984 Nov; 46:448-452.

Li Z, Pan X, Wang P-N, Chen J-Y e Mi L .Comparison of the killing effects between nitrogen-doped and pure TiO₂ on HeLa cells with visible light irradiation. **Nanoscale Research Letters**. 2013; 8:96.

Liu S, Xu L, Zhang T, Ren G, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. **Toxicology**. 2010 Nov; 267:172-177.

Ma L, Zhao J, Wang J, Liu J, Duan Y, Liu H. The acute liver injury in mice caused by nano-anatase TiO₂. **Nanoscale Research Letters**. 2009 Aug; 4: 1275-1285.

Machado P R L, Araújo M I A S, Carvalho L, Carvalho E M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2004 Dez; 79(6): 647-664.

Martin T R e Frevert C W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**. 2005 Sep; 2: 403-411.

Maynard A D. Safe handling of nanotechnology. **Nature**. 2006 Nov; 444: 267-269.

Medina C, Martinez S M J, Radomski A, Corrigan O I, Radomski M W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**. 2007 Jan; 150: 552-558.

Mendonça G, Mendonça D B S, Aragão F J L e Cooper L F. Advancing dental implant surface technology – from micron-to-nanotopography. **Biomaterials**. 2008 Jul; 29:3822–3835.

Mikkelsen L, Sheykhzade M, Jensen K A, Saber A T, Jacobsen N R, Vogel U. Modest effect on plaque progression and vasodilatory function in atherosclerosis-prone mice exposed to nanosized TiO₂. **Particle and Fiber Toxicology**. 2011; 8(32): 1-17.

Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. **Occupational Environmental Medicine**. 2007 Apr; 64: 609–615.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological methods**. 1983 Jun; 65: 55-63.

Nurkiewicz T R, Porter D W, Hubbs A F, Stone S, Chen B T, Frazer D G. Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling. **Toxicological Science**. 2009 Mar; 110(1): 191-203.

Oberdörster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm S C, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**. 1992; 97: 193-199.

Oberdörster G, Oberdörster E and Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**. 2005 Jul.; 113 (7): 823-839.

Oliveira M Q e Sadigursky M. A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada através dos mastócitos? **Revista Ciência Médica Biológica**. 2008 Abr.; 7:1: 31-39.

Olmedo D G, Tasat D R, Evelson P, Guglielmotti M B e Cabrini R L. Biological response of tissues with macrophages activity to titanium dioxide. **Wiley InterScience**. 2007 May; 1087-1093.

Onuma K, Sato Y, Ogawara S, Shirasawa N, Kobayashi M, Yoshitake J et al. Nano-scaled particles of titanium dioxide convert benign mouse fibrosa sarcoma cells into aggressive tumor cells. **The American Journal of Pathology**. 2009 Nov; 175(5): 2171-2183.

Palomäki J, Karisola P, Pylkkänen L, Savolainen K, Alenius H. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. **Toxicology**. 2010;(267):125–131.

Park E-J, Yi J, Chung K-H, Ryu D-Y, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology Letters**. 2008 Jul; 180:222-229.

Patri A, Umbreit T, Zheng J, Nagashima K, Goering P, Francke-Carroll S *et al.*. Energy dispersive X-ray analysis of titanium dioxide nanoparticle distribution after intravenous and subcutaneous injection in mice. **Journal of Applied Toxicology**. 2009 Mar; 29: 662-672.

Peters K, Unger R E, Kirkpatrick C J. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies, viability, proliferation and inflammation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 2004; 15: 321-325.

Puljaté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C *et al.*. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Particle and Fiber Toxicology**. 2011 Mar; (8):10.

Renwick L M, Donaldson K e Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2001 Dec; 172: 119–127.

Rocco M C, Mirkin C A e Hersam M C. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study. **Journal Nanoparticles Research**. 2011 March.

Ryabchikova E I, Mazurcova N A, Shikina N V, Ismagilov Z R. The crystalline of titanium dioxide nanoparticles affect their interactions with individual cells. **Journal of Medical Chemical, Biological and Radiological Defense**. 2010 Oct.

Sayes C M, Wahi R, Kurian P A, Liu Y, West J L, Ausman A D. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicological Sciences**. 2006 Apr; 92:174–185.

Schanen B C, Karakoti A S, Seal S, Drake D R, Warren W L, Self W T. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an *in vitro* human immune construct. **ACS Nano**. 2009 Sep; 3(9):2523-2532.

Scherbart A M, Langer J, Bushmelev A, Berlo D V, Haberzettl P, Schooten F-J V *et al.*. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. **Particle and Fiber Toxicology**. 2011 Oct; 8: 1-31.

Shichang L, Xu L, Zhang T, Ren G, Yang Z. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. **Toxicology**. 2010 Nov; 267:172-177.

Shy H, Magaye R, Castranova V e Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fiber Toxicology**. 2013; 10: 1-33.

Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? **Radiology and Oncology**. 2011Oct; 45(4):227-247.

Sohaebuddin S K, Thevenot P T, Baker D, Eaton J W, Tang L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size and cell type dependent. **Particle and Fiber Toxicology**. 2010 Aug; 7: 1-22.

Stanford -FDI- **Federation Dentaire Internationale**- Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. London, Technical Report- N°9- 1980.

Stearns R C, Paulauskis J D e Godleski J J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. **American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology**. 2001 Oct; 24: 108- 115.

U.S Food and Drug Administration, Listing of color additives exempt from certification, in title 21-Food and Drugs, code of federal regulations 73.575, U.S., 1996.

Umbreit T H, Francke-Carroll S, Weaver J L, Miller T J, Goering P L, Sadrieh N *et al.*. Tissue distribution and histopathological effects of titanium dioxide nanoparticles after intravenous or subcutaneous injection in mice. **Journal of Applied Toxicology**. 2011 Aug; 32: 350-357.

Valant J, Lavicoli I, Drobne D. The importance of a validated standard methodology to define *in vitro* toxicity of nano- TiO₂. **Protoplasma**. 2012 Set; 249:493-502.

Vamanu I C, Cimpan R M, Hoi J P, Sornes S, Lie A S, Gjerdet R N. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. **Toxicology in Vitro**. 2008 Jul; (22):1689-1696.

Warheit D B, Sayes C M, Reed K L e Swain K A. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety

considerations for assessing hazards and risks. **Pharmacology & Therapeutics**. 2008; 120:35–42.

Warheit D B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? **Toxicological Sciences**. 2008 Nov; 101: 183–185.

Williams D F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**. 2008 Apr; 1- 13.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T *et al.*, Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**. 2006; Vol 6, (8):1794-1807.

Xie G, Wang C, Sun J e Zhong G. Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. **Toxicology Letters**. 2011 May; 205: 55– 61

Yu J, Yu J C, Yu L, Ho W, Cheng B *et al.* Effects of acidic and basic activity and microstructures of bimodal mesoporous titania hydrolysis catalysts on the photocatalytic. **Journal of Catalysis**. 2003 Jan; 217: 69-78.

Zhang H & Banfield JF. Understanding Polymorphic Phase Transformation Behavior during Growth of Nanocrystalline Aggregates: Insights from TiO₂. **Journal Physical Chemistry A**. 2000 Jan; 217:69-78.

Zangh J, Song W, Guo J, Zhang J, Sun Z, Li L. Cytotoxicity of different sized TiO₂ nanoparticles in mouse macrophages. **Toxicology and Industrial Health**. 2012 Jun; I-II.

Zangh R, Yuhong B, Zhang B, Lingxin C, Bing Y. The potential health risk of titania nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**. 2012 Nov; 211-212.

Zhaoxiaj J I, Jin X, George S, Xia T, Meng H, Wang X. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. **Environmental Science & Technology**. 2010 May; 44(19): 7309-7314.

OBRAS CONSULTADAS:

Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª ed., Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2008.

Anusavice KJ. **Philips Materiais Dentários**. 11ª ed., Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2004.

Carmem M P e Rui Curi. **Como Cultivar Células**. São Paulo, Editora Guanabara Koogan, 2005.

Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. **Imunologia Ilustrada**. São Paulo, Artmed® Editora S.A, 2008.

Junqueira L C. **Histologia Básica Texto e Atlas**. 11ª ed., Editora Guanabara Koogan, 2008.

Michalany J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 2ª ed., São Paulo, Editora Michalany, 1990.

Silva, A M, Pinheiro, M S F, França, Maira N. **Guia para normalização de trabalhos técnico-científicos: projetos de pesquisa, trabalhos acadêmicos, dissertações e teses**. 5ª ed., Uberlândia, Edufu, 2005.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 101/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 026/10

Projeto Pesquisa: "Síntese e caracterizações de nanocompósitos à base de ZnO, TiO₂ e hidroxiapatita para aplicações como nanobiomateriais em odontologia".

Pesquisador Responsável: Adriano Mota Loyola

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 23 de junho de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente do CEUA/UFU