

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização e estudo da Citotoxicidade de nanocristais de Dióxido de Titânio Puro e dopados com Európio e Cálcio

Luíza Cristina Macêdo Silva

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização e estudo da Citotoxicidade de nanocristais de Dióxido de Titânio Puro e dopados com Európio e Cálcio

Luíza Cristina Macêdo Silva

Prof.^a Dr.^a Camilla Christian Gomes Moura

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização e estudo da Citotoxicidade de nanocristais de Dióxido de Titânio Puro e
dopados com Európio e Cálcio

Luíza Cristina Macêdo Silva

Prof.^a Dr.^a Camilla Christian Gomes Moura
Faculdade de Odontologia

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/____

Edgar Silveira Campos
Coordenador do Curso de Biotecnologia

Uberlândia - MG
Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização e estudo da Citotoxicidade de nanocristais de Dióxido de Titânio Puro e dopados com Európio e Cálcio

Luíza Cristina Macêdo Silva

Aprovado pela Banca Examinadora em: 09/07/2019

Nota: _____

Prof.^a Dr.^a Camilla Christian Gomes Moura

Uberlândia, 09, de julho de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô, Simpliciano Macedo, por ser a minha inspiração diária de perseverança e otimismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Nossa Senhora Aparecida, por ter intercedido por mim junto a Deus e por ter iluminado o meu caminho durante toda a minha vida, me norteando e sendo meu esteio nos momentos de dúvida.

Agradeço aos meus pais, Sandra e Ernandes, por todo amor, carinho, compreensão e companheirismo durante essa trajetória. Muito obrigada, por confiarem nas minhas decisões e estarem partilhando esse sonho comigo e comemorando (até que enfim) essa vitória.

Á todos os meus familiares, em especial a Tia Eriziane, meu Padrinho Lucas e minhas primas/irmãs Amanda, Rafaella e Rayanne, que me acompanharam desde o início, por todo suporte seja na forma de conselho ou com um momento de descontração.

Agradeço também ao meu namorado Jackson, por estar sempre ao meu lado e por ter compreendido a minha ausência no tempo dedicado aos estudos.

A Prof.^a Dr.^a Camilla Christian Gomes Moura, por acreditar no meu potencial e pela oportunidade de me orientar e proporcionar os ensinamentos necessários para a realização deste trabalho.

A M.a. Gabriela Leite de Souza, pela constante paciência e solicitude, compartilhando seus conhecimentos e me ajudando durante as práticas laboratoriais e na execução dessa monografia.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente na minha formação pessoal e profissional, me fornecendo as bases para a concretização deste projeto.

RESUMO

O número crescente de pesquisas que buscam a utilização de nanomateriais no campo médico-odontológico é vigente, principalmente para o tratamentos de doenças periodontais. Frente a isso, as nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO_2), por apresentarem propriedades como boa tenacidade a fratura, alta resistência à corrosão e também minimizar o risco a infecções bacterianas tem se destacado em aplicações voltadas para a reconstrução do tecido ósseo. Contudo, a carência de estudos que abordem a citotoxicidade de nanomateriais impossibilita a aplicação segura destes. Assim, o presente trabalho visa avaliar o efeito citotóxico de nanopartículas cristalinas (NCs) de TiO_2 puras e dopadas com Európio e Cálcio em osteoblastos imortalizados (SAOS-2). Para isso, os NCs foram sintetizados pelo método de co-precipitação e suas propriedades físicas foram investigadas através de Difração de Raio-X (DRX), Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Luminescência. Para os testes biológicos realizou-se o Ensaio MTT de citotoxicidade nas concentrações de 10,50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ no período de 24 horas e a Microscopia de Fluorescência no intervalo de 4 e 24 horas. Os resultados obtidos indicaram que os nanocristais não apresentaram perfil citotóxico em nenhuma das concentrações testadas, e não alteraram a morfologia celular, sendo, a fluorescência identificada em todos os ensaios realizados, exceto para as amostras TiO_2 e $\text{TiO}_2:4\text{Eu}:5\text{Ca}$. Assim, esses ensaios demonstraram que os nanocristais não apresentaram citotoxicidade as células utilizadas no estudo e, consequentemente, potencial de uso na odontologia e ortopedia.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Nanopartícula, TiO_2

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	4
2.1.Objetivo Geral	4
2.2.Objetivos Específicos	4
3.METODOLOGIA	4
3.1.Síntese dos Biomateriais.....	4
3.2.Ensaio Físicos	4
3.2.1.Difração de Raio-X (DRX).....	4
3.2.2.Espectroscopia Raman.....	5
3.2.3.Espectroscopia de Luminescência	5
3.3.Ensaio Biológicos	5
3.3.1.Cultura de Células	5
3.3.2.Tratamento com nanocristais.....	6
3.3.3.Ensaio MTT de Citotoxicidade.....	7
3.3.4.Fluorescência dos nanocristais	7
3.3.5.Análise Estatística	7
4.RESULTADOS.....	7
4.1.Difração de Raio-X.....	7
4.2.Espectroscopia Raman	8
4.3.Espectroscopia de Luminescência	10
4.4.Ensaio MTT de Citotoxicidade	11
4.5.Fluorescência dos nanocristais	12
5.DISSCUSSÃO	16
6.CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática do layout da placa de 96 poços preenchida com TiO_2 ; TiO_2 : 4 Eu; TiO_2 : 4 Eu: 0,5 Ca; TiO_2 : 4 Eu: 1 Ca; TiO_2 : 4 Eu: 5 Ca e TiO_2 : 4 Eu: 10 Ca nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$	6
Figura 2. Difrátograma de Raio-X dos nanocristais de TiO_2 puro e dopados com Cálcio (Ca) a temperatura ambiente.	8
Figura 3. Espectro Raman das nanopartículas cristalinas de TiO_2 puro e dopados com Cálcio (Ca) a temperatura ambiente.	9
Figura 4. Espectros de luminescência dos nanocristais de TiO_2 puro e dopados com Európio (Eu) e Cálcio (Ca) a temperatura ambiente.	10
Figura 5. Gráfico referente ao nível de absorbância das nanopartículas testadas e do grupo controle.	11
Figura 6. Gráfico referente ao nível de absorbância das concentrações das nanopartículas testadas (10,50 e 100 $\mu\text{g/mL}$)	12
Figura 7. Microscopia de fluorescência do dióxido de Titânio no período de 4 horas (fig.8 A,B e C) e no período de 24 horas (fig.8 D,E e F)	13
Figura 8. Microscopia de fluorescência da nanopartículas TiO_2 : 4Eu no período de 4 horas (Fig. 9 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 9 D,E e F)	13
Figura 9. Microscopia de fluorescência do NCs TiO_2 :4Eu:0.5Ca no período de 4 horas (Fig. 10 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 10 D,E e F).	14
Figura 10. Microscopia de fluorescência do NCs TiO_2 :4Eu: 1Ca no período de 4 horas (Fig. 11 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 11 D,E e F).	14
Figura 11. Microscopia de fluorescência da nanopartículas TiO_2 : 4Eu:5Ca no período de 4 horas (Fig. 12 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 12 D,E e F).	15

Figura 12.Microscopia de fluorescência do NCs $\text{TiO}_2\text{:4Eu:10 Ca}$ no período de 4 horas (Fig. 13 A, B e C) e no período de 24 horas (Fig. 13 D, E e F).

15

LISTA DE ABREVIATURAS

BCRJ- Banco de Células do Rio de Janeiro

Ca²⁺ - Íon Cálcio

CaO- Óxido de Cálcio

DMEM- Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DRX- Difração de Raio-X

Eu³⁺ - Íon Európio

JB6- Células Epidérmicas de Camundongos

JCPDS- *Joint Committee for Powder Diffraction Studies*

mL- Mililitro

MTT formazan- (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo)

NCs- Nanocristais

nm- Nanômetro

NMTS- Nanomateriais

NPs – Nanopartículas

RPM- Rotações por minuto

SAOS 2- Osteoblastos de osteossarcoma humano imortalizado

SFB- Soro Fetal Bovino

Ti³⁺ - Íon Titânio

TiO₂ – Dióxido de Titânio

µg- Micrograma

XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)2H-tetrazólio-5-carboxanilida

1. Introdução

A nanotecnologia define-se como a aplicação dos conhecimentos científicos a fim de manipular materiais e sistemas em nanoescala, cujas estruturas e componentes exibem propriedades novas e significativamente alteradas, nos níveis atômico, molecular e supramolecular. (PINA *et al.*, 2005; WEBSTER; AHN, 2006; KHURSHID *et al.*, 2015)

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tem sido aplicada em vários campos, pois oferece formas alternativas para resolução de problemas nos campos médico e científico. Sua aplicabilidade estende-se à indústria biotecnológica, eletrônica, aeroespacial e mais recentemente, ao campo da odontologia, em que novos nanomateriais (NMTs) tem sido introduzidos para detecção e tratamento de patologias comuns, doenças periodontais, pulpares e periapicais. (KHANNA *et al.*, 2015; NEEL *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018; POKROWIECKI *et al.*, 2018)

Dentre os nanomateriais estudados destacam-se as nanopartículas (NPs) por exibirem alta estabilidade, solubilidade, multifuncionalidade (AGARWAL *et al.*, 2019). Por definição, nanopartículas são substâncias que possuem pelo menos uma de suas dimensões menor que 100 nm (CHEN *et al.*, 2018). Tais partículas podem ser projetadas e sintetizadas em uma variedade de tamanhos, formas (tubos, esferas, hastes e prismas) e composição (materiais baseados em metais, óxidos metálicos, pontos quânticos e nanomateriais em 02 carbonos) (DOAK *et al.*, 2009).

Estudos tem demonstrado que as nanopartículas podem exibir propriedades adesivas, bem como propriedades terapêuticas como atividade antimicrobiana, anti-inflamatórias, anti-oxidantes, anti-angiogênicas e maior atividade catalítica quando comparadas com os materiais a granel. (AGARWAL *et al.*, 2019)

As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) representam uma porcentagem substancial de biomateriais funcionais amplamente fabricadas no mundo. Segundo o banco de dados do Woodrow Wilson Center, aproximadamente 9% dos produtos de consumo listados composto por nanomateriais, contêm nanopartículas de TiO₂. (BOLAND *et al.*, 2014; NISKA *et al.*, 2015)

Devido à sua biocompatibilidade, boa tenacidade à fratura, relativamente baixo módulo de elasticidade, alta relação resistência/peso e excelente resistência à corrosão, as NPs de TiO₂ tem sido utilizadas na fabricação de protetores solares, cosméticos, produtos alimentícios,

produtos farmacêuticos e reagentes nanomédicos. Além disso, quando adicionadas aos implantes ortopédicos aumentam sua durabilidade frente a danos mecânicos, principalmente a rachaduras e quebra, e minimizam o risco de infecções bacterianas. Devido a essas propriedades, essas NPs tem sido cada vez mais utilizadas na constituição de próteses e arcabouços para reconstrução de tecido ósseo. (ZHAO *et al.*, 2013; NISKA *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2017)

Por outro lado, alguns estudos sugerem que as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais tão atrativos do ponto de vista físico-químico, podem também ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos (LANDSIEDEL *et al.*, 2009; PASCHOALINO *et al.*, 2010). Reduções no tamanho podem alterar as características do material em comparação com partículas maiores ou com a mesma substância em solução, uma vez que as partículas em escala nanométricas exibem uma relação superfície-massa maior, aumentando sua reatividade. (WINKLER *et al.*, 2018)

Zhao *et al.* (2013) demonstraram que as NPs de TiO_2 causavam maior citotoxicidade do que partículas micrométricas em células epidérmicas de camundongos (JB6). Em razão de sua pequena dimensão, as NPs podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, além de ter seu efeito tóxico aumentado, já que o grande número de átomos na área superficial da partícula promove uma reatividade superior (NEL *et al.*, 2006).

Estudos recentes indicaram que as nanopartículas de dióxido de titânio podem induzir quebras nas cadeias duplas de DNA nas células da medula óssea após a administração oral. (CHEN *et al.*, 2014). Os efeitos de toxicidade do TiO_2 particulado também foram observados em células do sistema circulatório. A título de exemplificação, Zhao *et al.* (2013) verificaram que os eritrócitos tratados com NPs de TiO_2 foram submetidos a sedimentação anormal, hemaglutinação e hemólise, resultados que diferem daqueles observados nos grupos tratados com partículas finas de TiO_2 .

Semelhantemente, Zhang *et al.* (2011) observaram que NPs de TiO_2 estimulavam a expressão gênica pró-inflamatória em células pré-osteoblasticas (MC3T3-E1). Enquanto, estudos *in vivo* realizado por Wang *et al.* (2009) indicaram que as NPs de TiO_2 são potencialmente tóxicas para órgãos como coração, pulmão e fígado, além de causar danos às articulações dos joelhos de coelhos.

Em virtude a essa problemática, pesquisadores destinaram os seus estudos para o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de potencializar os efeitos benéficos das nanopartículas e monitorar os mecanismos subjacentes à interação celular. Dessa forma, a dopagem com elementos metálicos e não metálicos possibilita aumento na atividade catalítica, fotoestabilidade, como também propriedades luminescentes. (AHAMED *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2017)

Assim, a dopagem com o íon Európio (Eu^{3+}) confere propriedades fluorescentes á nanoestrutura incorporadora, podendo ser utilizada na avaliação da biodistribuição tecidual, além disso, configura-se como um método seguro, altamente sensível e barato quando comparado aos fluoróforos orgânicos. (SANDOVAL *et al.*, 2012). Ademais Zeng *et al.* (2017) em publicação recente, afirma que esse elemento não conferiu nenhuma toxicidade adicional para as células-tronco mesenquimais da medula óssea.

Similarmente, a dopagem com o Cálcio (Ca^{2+}) reforça a matriz de colágeno, conferindo resistência mecânica, por conseguinte, possui a capacidade de induzir uma resposta biológica específica ao tecido ósseo, sendo essa, similar ao processo de remodelação óssea, tendo a sua utilização voltada para a ortopedia e odontologia. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002; BARRÈRE *et al.*, 2006)

A partir dessas informações, torna-se clara a importância dos estudos da toxicidade de nanopartículas, visto que existem vários fatores que contribuem para esse efeito de citotoxicidade, tais como o seu tamanho, forma, composição química e presença de impurezas. (SYAMA *et al.*, 2014). A modificação das características físico-químicas das nanopartículas pode alterar sua citotoxicidade, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas mais seguras impedindo potenciais efeitos prejudiciais aos sistemas biológicos. (BOLAND *et al.*, 2014).

Salienta-se que as nanopartículas podem ser cristalinas, denominadas nanocristais (NCs), ou amorfas com propriedades físicas e biológicas distintas. Por exemplo, Reis *et al.* (2015) demonstraram que nanocristais são menos genitóxicos do que as nanopartículas amorfas. Portanto, nesse trabalho foram estudadas nanopartículas cristalinas.

Dessa forma, dado ao crescente uso do TiO_2 nanoparticulado e sua importância comercial, avaliamos as interações no ambiente biológico de nanocristais de TiO_2 incluindo a citotoxicidade e internalização dessas nanopartículas cristalinas por osteoblastos (SAOS-2), a

qual foi monitorada através da dopagem com Eu^{3+} , um metal tem propriedades luminescentes, que age como uma sonda fluorescente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito citotóxico bem como, a fluorescência dos nanocristais de TiO_2 luminescentes puros e dopados com Európio e Cálcio ($\text{TiO}_2\text{:Eu:Ca}$) em osteoblastos imortalizados.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar as propriedades estruturais e ópticas dos nanocristais $\text{TiO}_2\text{:TiO}_2\text{: 4 Eu}$; $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 0,5 Ca}$; $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 1 Ca}$; $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 5 Ca}$ e $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 10 Ca}$.
- Averiguar a citotoxicidade na linhagem celular SAOS-2 do composto testado, por meio de ensaio de viabilidade celular (MTT-Formazan);
- Monitorar o tráfico intracelular das nanopartículas cristalinas testadas.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese dos biomateriais

Os nanocristais foram sintetizados pela Prof^a. Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva no Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas. Pelo método da co-precipitação, estes nanocompósitos de TiO_2 foram sintetizados e dopados com concentrações crescentes de Európio (Eu) e Cálcio (Ca), sendo elas ($\text{TiO}_2\text{:TiO}_2\text{: 4 Eu}$; $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 0,5 Ca}$; $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 1 Ca}$; $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 5 Ca}$ e $\text{TiO}_2\text{: 4 Eu: 10 Ca}$). Posteriormente, afim de caracterizar as propriedades estruturais e ópticas, os nanomateriais foram avaliados através dos métodos de difração de Raios-X e espectroscopia Raman.

3.2. Ensaios Físicos

3.2.1. Difração de Raio-X (DRX)

Para esta análise, utilizou-se um difratômetro de raios-X da marca Shimadzu modelo XRD-6000 (Quioto, Quioto, Japão), instalado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química- IQUFU. As amostras foram expostas a radiação monocromática $\text{Cu-K}\alpha_1$ ($\lambda=1.54056$

Å), com ângulo 2θ , entre 10° e 100° , em varredura contínua, passo angular de 0.02 segundos, tensão 40 kV e corrente de 30 mA. Os difratogramas foram obtidos através do *software* XRD 6000, através dos padrões detectados pelos raios-X difratados, mapeando a rede cristalina do composto e possibilitando a análise da estrutura gerada pelo espalhamento de raios.

3.2.2. Espectroscopia Raman

Nas medidas de espectroscopia Raman, foi utilizado um espectrômetro LabRAM HR *Evolution* da marca Horiba (Quioto, Quioto, Japão), localizado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Física- INFIS da Universidade Federal. Utilizou-se o comprimento de onda de excitação do laser nas amostras em 523 nm, possuindo como região espectral de interesse de 1000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . A amostra foi analisada na forma de pó disperso sobre uma lâmina de microscópio.

3.2.3. Espectroscopia de Luminescência

Para as medidas de espectroscopia de luminescência, foi operado um espectrômetro LabRAM HR *Evolution* da marca Horiba (Quioto, Quioto, Japão), instalado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Física- INFIS da Universidade Federal. A análise da amostra foi feita na forma de pó disperso sobre uma lâmina de microscópio e utilizando o comprimento de onda de excitação do laser nas amostras em 325 nm.

3.3. Ensaios Biológicos

3.3.1. Cultura de células

Osteoblastos de osteossarcoma humano de linhagem SAOS-2 foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivados em garrafas de cultura de poliestireno de 75 cm^2 , com meio Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (DMEM; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (SFB; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e 1% de antibiótico-antimicótico (A5955; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO_2 e o meio foi trocado a cada dois dias.

Após atingirem confluência, as células foram soltas utilizando tripsina-EDTA (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) durante 3 minutos. Em seguida, a enzima foi neutralizada com o uso do meio de cultura completo e a suspensão celular resultante transferida para tubos *falcon* e subsequentemente, centrifugada por 10 minutos a 1100

rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e houve a ressuspensão do botão celular no meio de cultivo.

As células foram contadas pelo método de exclusão por Azul de Tripán em câmara de Neubauer e plaqueadas em uma densidade de 2×10^4 células/ poço em placas de poliestireno de 96 poços, as quais permaneceram em incubadora umidificada a 37°C por um período de 24 horas.

3.3.2. Tratamento com os nanocristais

Os seis diferentes nanocristais (TiO_2 ; TiO_2 : 4 Eu; TiO_2 : 4 Eu: 0,5 Ca; TiO_2 : 4 Eu: 1 Ca; TiO_2 : 4 Eu: 5 Ca e TiO_2 : 4 Eu: 10 Ca) foram solvatados em água destilada a fim de que se obtivesse uma solução estoque concentrada à 1 mg/mL. Essa solução foi autoclavada e diluída em meio de cultura suplementado com 10% de SFB para estabelecer as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ que foram adicionadas nas células em quadruplicata. A placa foi incubada durante o período de 24 a horas a 37°C .

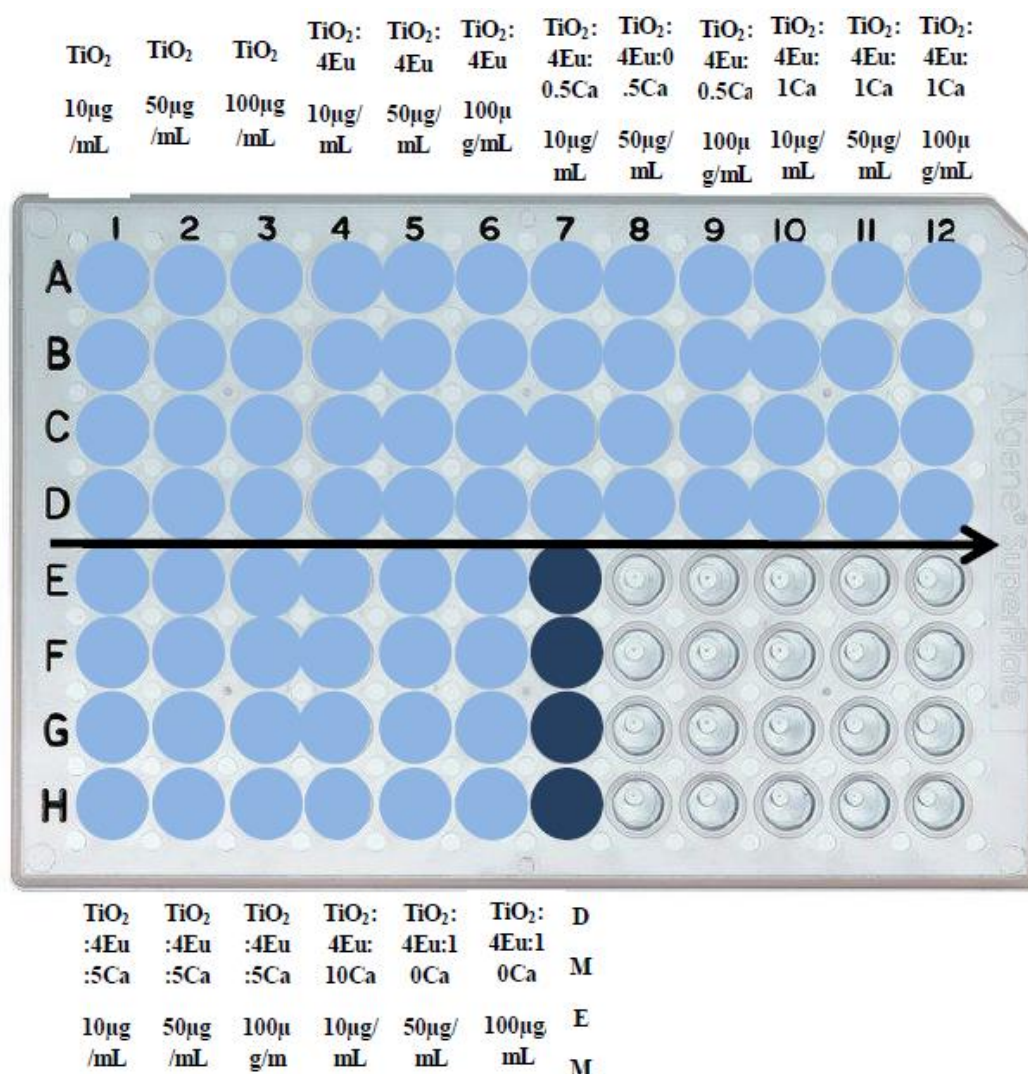


Figura 1: Representação esquemática do layout da placa de 96 poços preenchida com TiO_2 ; TiO_2 : 4 Eu; TiO_2 : 4 Eu: 0,5 Ca; TiO_2 : 4 Eu: 1 Ca; TiO_2 : 4 Eu: 5 Ca e TiO_2 : 4 Eu: 10 Ca nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$

3.3.3. Ensaio MTT de Citotoxicidade

As células foram avaliadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT formazan (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo). Este teste colorimétrico avalia a capacidade das desidrogenases mitocondriais reduzirem o MTT convertendo os sais amarelos de tetrazolium em cristais de formazan, de cor púrpura.

Após o período de aderência das células tratadas, houve a remoção do meio de cultura para que fosse adicionado o reagente MTT na concentração de 5 mg/mL, seguida de incubação da placa a 37° C por 4 horas. Concluído o tempo, a solução foi removida e substituída por 100 µL/poço de Dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) para a completa dissolução dos cristais de formazan resultantes. A placa foi submetida à leitura de viabilidade através de níveis de absorbância com o comprimento de onda de 570 nm utilizando o equipamento Biochrom Asys UVM340 (Cambourne, Cambridge, Reino Unido).

3.3.4. Fluorescência dos nanocristais

A microscopia de fluorescência (EVOS Imaging System, Thermo Fisher, São Paulo, Brasil) foi realizada no intuito de monitorar o tráfico intracelular dos nanocristais. Dessa forma, a linhagem SAOS-2 foi previamente tratada com as nanopartículas TiO₂; TiO₂:4 Eu; TiO₂:4 Eu:0,5 Ca; TiO₂: 4 Eu:1 Ca; TiO₂: 4 Eu: 5 Ca e TiO₂: 4 Eu: 10 Ca nas concentrações anteriormente estabelecidas de 10 µg/mL, 50µg/mL e 100 µg/mL. A análise da fluorescência ocorreu após o contato durante 04 e 24 horas. As células foram avaliadas utilizando-se o filtro GFP, com excitação de 470/22 e emissão de 510/42.

3.3.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foram submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade de Shapiro-Wilk e Levene, como também a Análise de variância em fator único, teste de Tukey entre os grupos experimentais e Dunnet entre os grupos experimentais e o grupo controle com o α tabelado a 0,05 % fazendo uso do *software* Sigma Plot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Difração de Raio-X

A análise do difratograma permite identificar as fases e a estrutura cristalina presente nas amostras, mediante a identificação dos picos característicos de cada fase. A cristalinidade é determinada através da intensidade e extensão dos picos, consoante a difração de Bragg. Os difratogramas de raios X mostraram picos de difração de Bragg característicos de TiO_2 com estrutura tetragonal da fase anatase (JCPDS: 21-1272) confirmando a formação de nanocristais de TiO_2 . Com o aumento na concentração de Ca, nós observamos um aumento no pico de difração para menores ângulos. Esse deslocamento está relacionado a incorporação substitucional dos íons Ti^{+3} por Ca^{+2} na estrutura cristalina do TiO_2 , uma vez que o raio iônico do Ca^{+2} (0.99 Å) é maior do que o raio iônico do Ti^{+3} (0.60 Å). Além do mais, observou-se a presença de picos de difração de Bragg característicos de CaO NCs (JCPDS: 00-037-1497) foram observados começando na concentração de 0.5 de Ca e intensificou com o aumento na concentração de cálcio nas amostras.

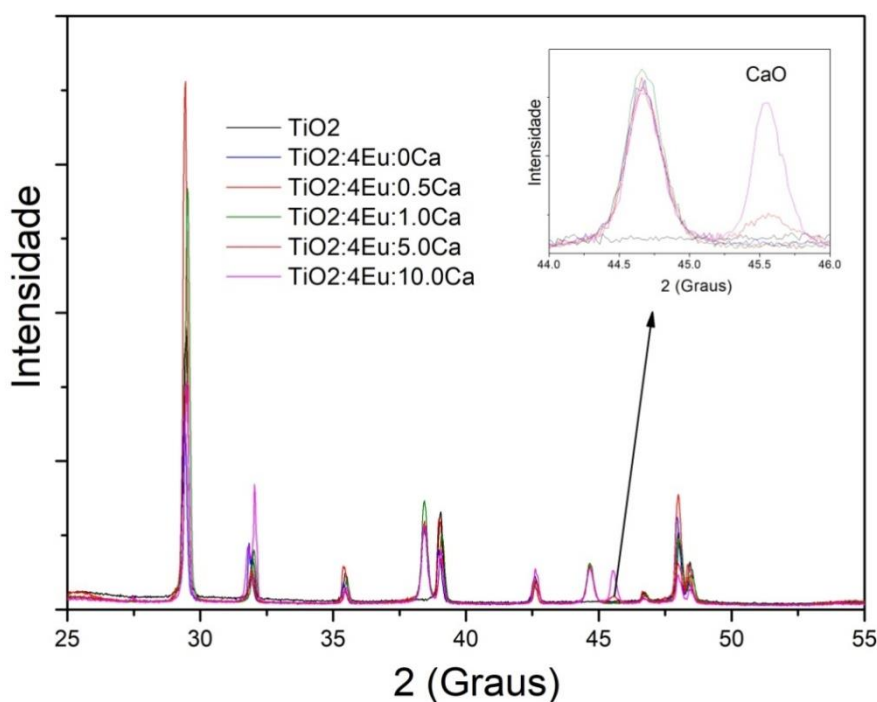


Figura 2: Difratograma de Raio-X dos nanocristais de TiO_2 puro e dopados com Cálcio (Ca) a temperatura ambiente.

4.2. Espectroscopia Raman

Observa-se na figura 3 os espectros Raman das amostras. No espectro Raman dos nanocristais de TiO_2 observa-se bandas características dos modos vibracionais da fase

anatase. Ao incorporar os íons de Eu na síntese, observa-se que eles foram incorporados substitucionalmente e no modo longitudinal, uma vez que ocorre uma diminuição da banda centrada em 150 cm^{-1} . Nos espectros dos nanocristais de TiO_2 contendo íons de Eu e Ca, observa-se que ocorre um rearranjo dos íons e que os íons de Eu não estão mais localizados no modo longitudinal e sim o íon Ca, sendo que a medida que aumenta a concentração de Ca ocorre a diminuição desse modo.

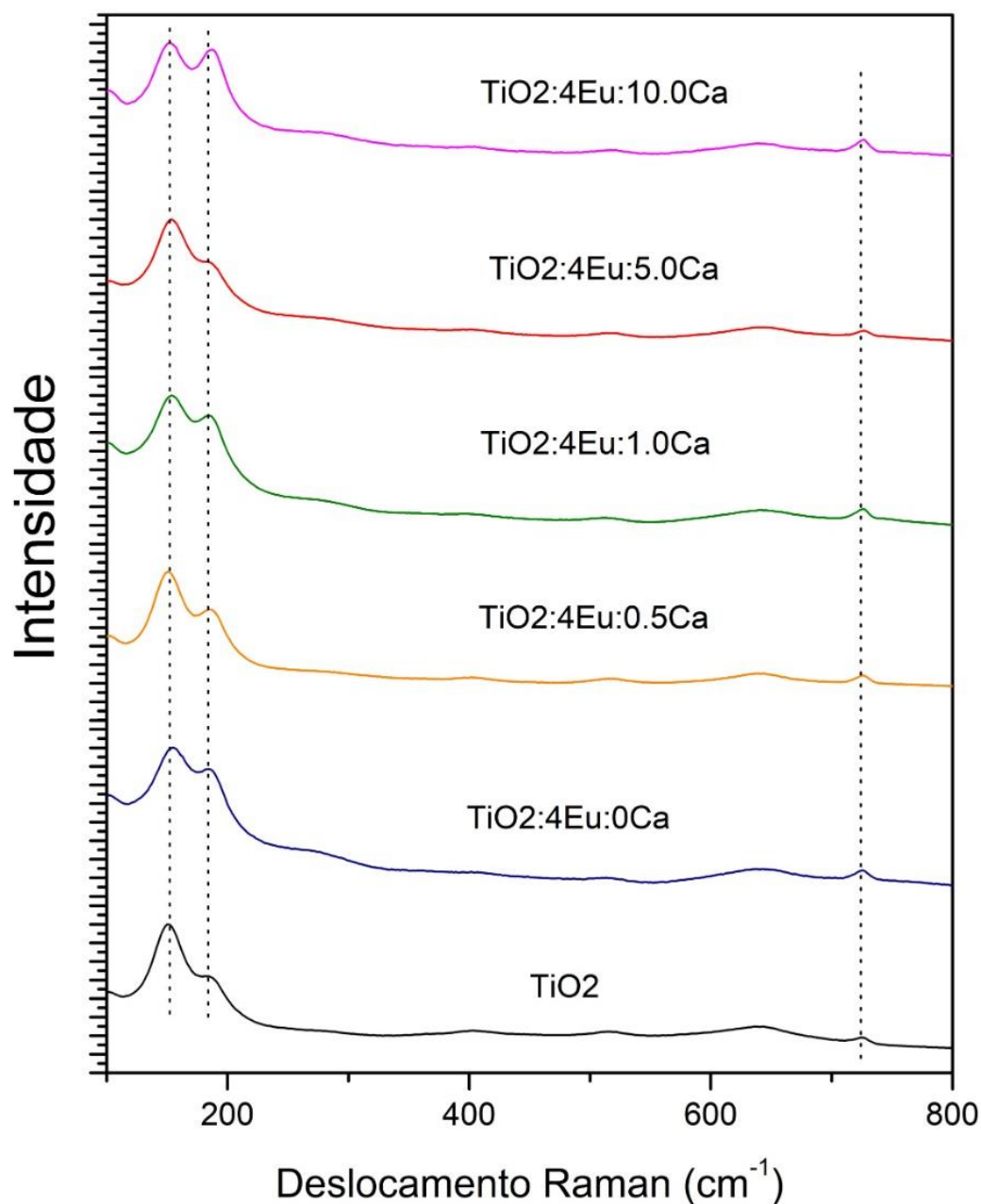


Figura 3: Espectro Raman das nanopartículas cristalinas de TiO_2 puro e dopados com Cálcio (Ca) a temperatura ambiente.

4.3. Espectroscopia de Luminescência

A Figura 4 mostra os espectros de luminescência das amostras com linha de excitação de 325 nm. O espectro de luminescência dos nanocristais de TiO_2 apresenta uma banda larga na faixa de 400 a 800 nm. Na amostra dopada apenas com Eu, observa-se a banda larga associada a emissão dos nanocristais de TiO_2 , menos intensa, e as bandas de emissão característica dos íons de Eu. Nos espectros de luminescência das amostras dopadas com Eu e Ca, observa-se claramente que ocorre o rearranjo dos íons em excelente acordo com os dados de DRX e Raman, ocorrendo um aumento na intensidade de luminescência dos nanocristais de TiO_2 e uma diminuição da intensidade dos íons de Eu, em comparação ao espectro da amostra dopada apenas com Eu. Além disso, observa-se que com o aumento da concentração de Ca ocorre uma supressão da luminescência dos nanocristais de TiO_2 .

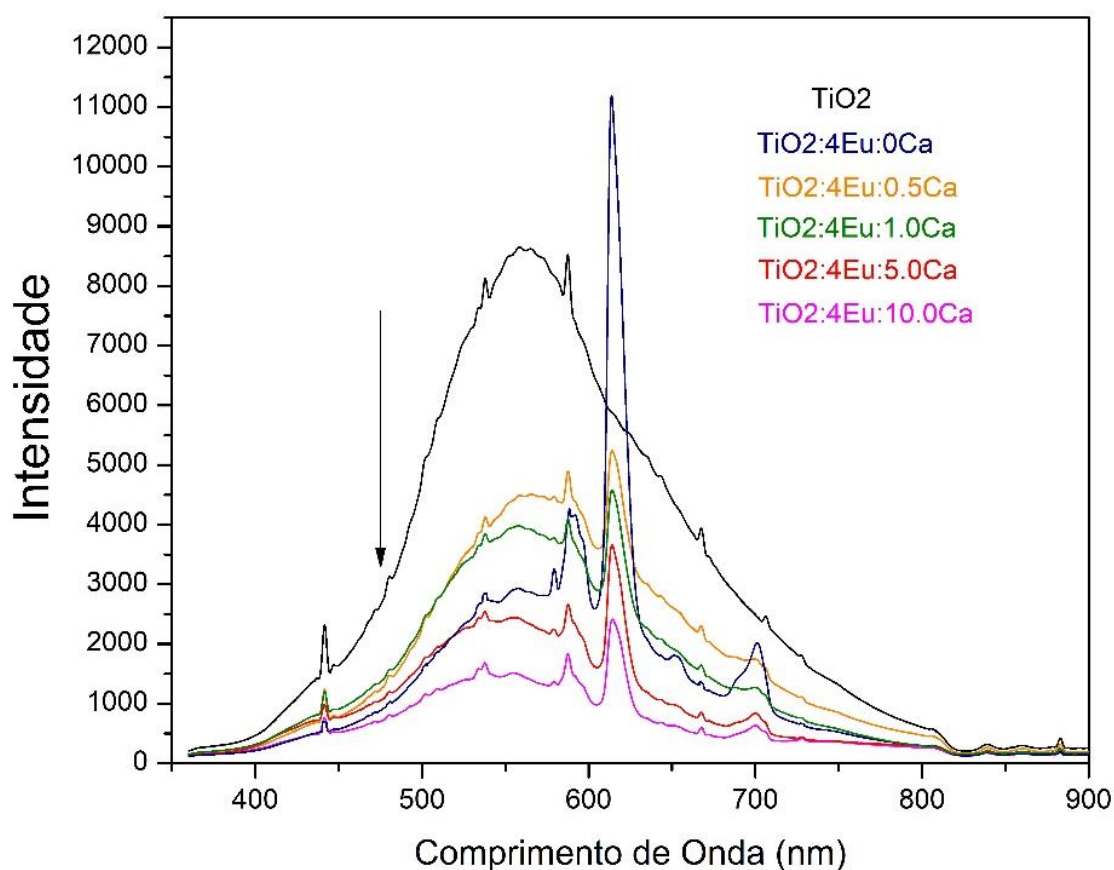


Figura 4: Espectros de luminescência dos nanocristais de TiO_2 puro e dopados com Európio (Eu) e Cálcio (Ca) a temperatura ambiente.

4.4. Ensaio MTT de Citotoxicidade

A partir dos dados obtidos na leitura do ensaio de MTT, foi possível estimar indiretamente a viabilidade celular, tendo em vista que a densidade óptica do nível de absorbância de cada poço foi proporcional á quantidade de cor, que por sua vez era proporcional ao número de células viáveis.

Os nanocristais de TiO_2 e $\text{TiO}_2:4\text{Eu}:1 \text{ Ca}$ na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença nos níveis de absorbância ($p > 0.05$) embora diferiram quanto ao grupo controle, apresentando menores níveis de viabilidade celular ($p < 0.05$). Por outro lado, as nanopartículas de $\text{TiO}_2:4\text{Eu}$, $\text{TiO}_2:4\text{Eu}:0.5 \text{ Ca}$ e $\text{TiO}_2:4\text{Eu}: 10 \text{ Ca}$ não diferiram entre si ($p > 0.05$) e também em relação ao grupo controle ($p > 0.05$). As células tratadas com $\text{TiO}_2:4\text{Eu}:5\text{Ca}$ foram semelhantes ao grupo controle apenas na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, enquanto nas concentrações de $50 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$ apresentaram menor viabilidade ($p < 0.05$).

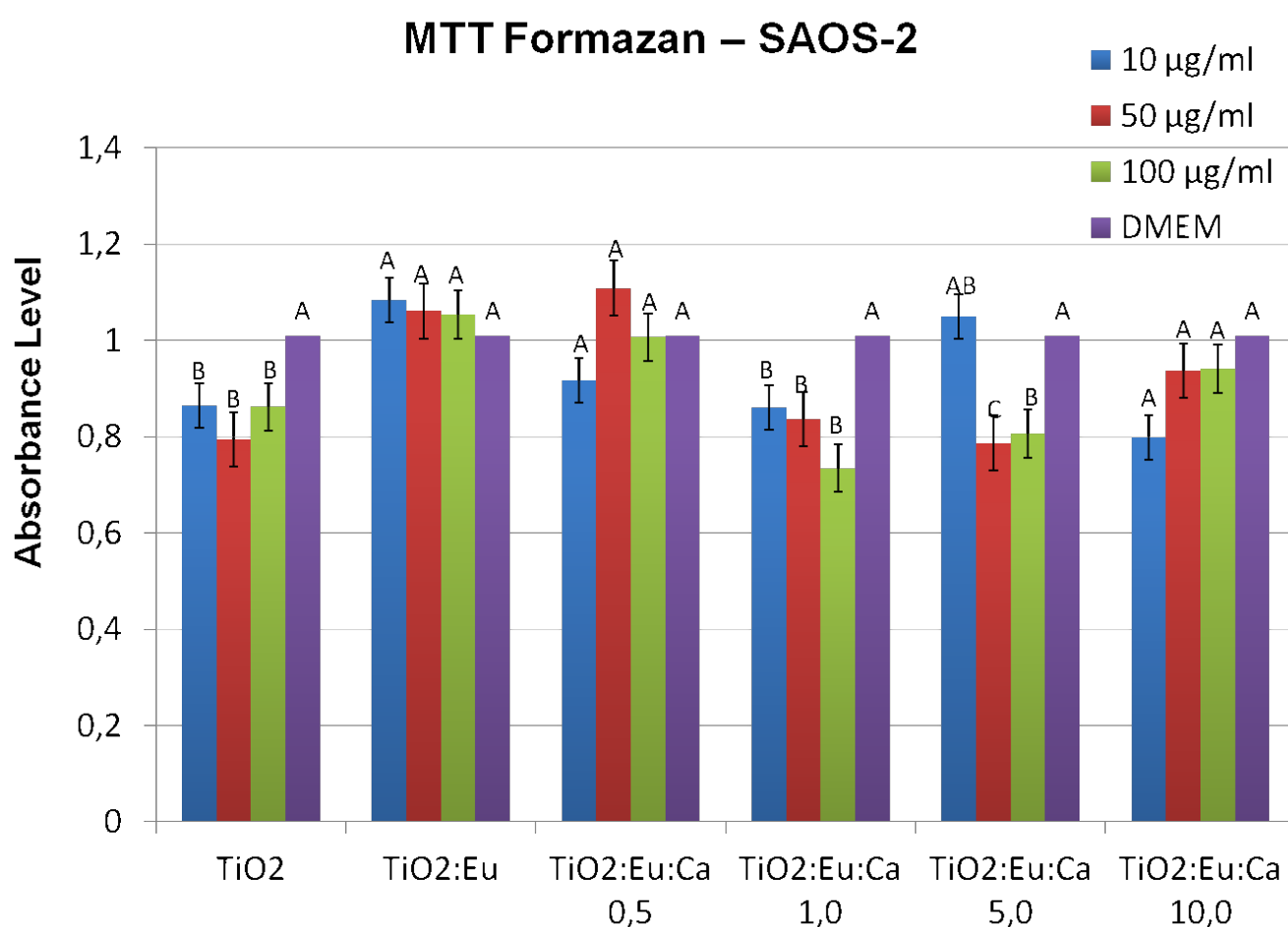


Figura 5: Gráfico referente ao nível de absorbância das nanopartículas testadas e do grupo controle.

Quando comparadas as diferentes nanopartículas na concentração de 10µg/mL não foram observadas alterações nos níveis de absorbância do TiO₂ não dopados frente as demais dopagens ($p > 0.05$), exceto o grupo TiO₂:4Eu:10 Ca que foi estatisticamente distinto na concentração estudada, apresentando menor viabilidade celular ($p < 0.05$).

Ainda na figura 6 é possível observar um padrão semelhante nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL, tendo em vista que as nanopartículas TiO₂:4Eu e TiO₂:4Eu:0.5 Ca apresentam viabilidade superior comparado com os grupos TiO₂, TiO₂:4Eu:1 Ca e TiO₂:4Eu:5 Ca.

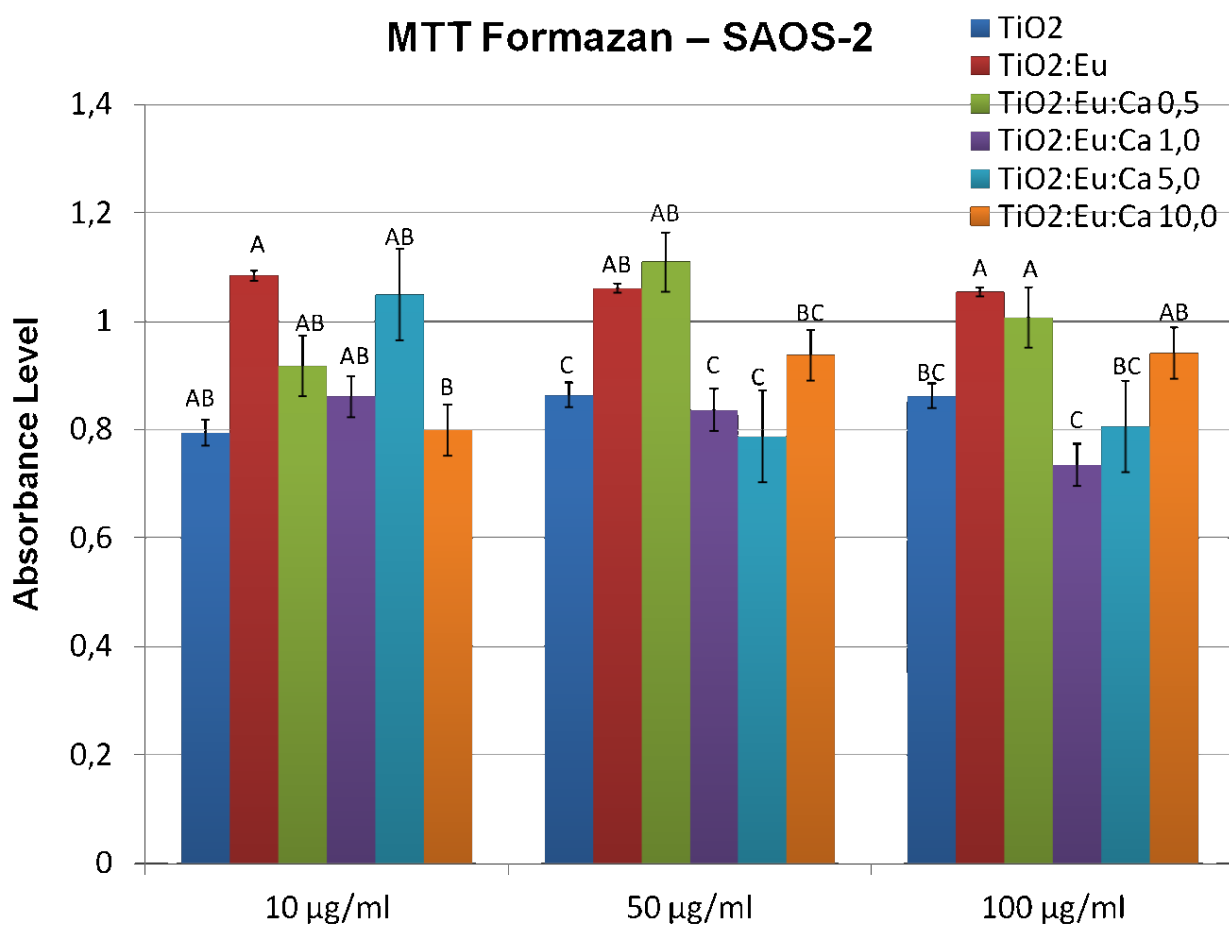


Figura 6: Gráfico referente ao nível de absorbância das concentrações das nanopartículas testadas (10,50 e 100 µg/mL).

4.5. Fluorescência dos Nanocristais

O padrão de fluorescência dos nanocristais de TiO₂ dopados com Európio e Cálcio em suas diferentes concentrações avaliadas estão ilustrados nas figuras de 8 a 14.

A figura 8 permite constatar que não ocorreu a internalização das NPs em nenhum dos tempos de tratamento, 4 e 24 horas, como também em nenhuma das concentrações avaliadas. Fica evidente, que a ausência do elemento químico Európio leva a não fluorescência do

nanocristal de Dióxido de Titânio puro, tendo em vista, que em sua composição não há elementos fluoróforos.

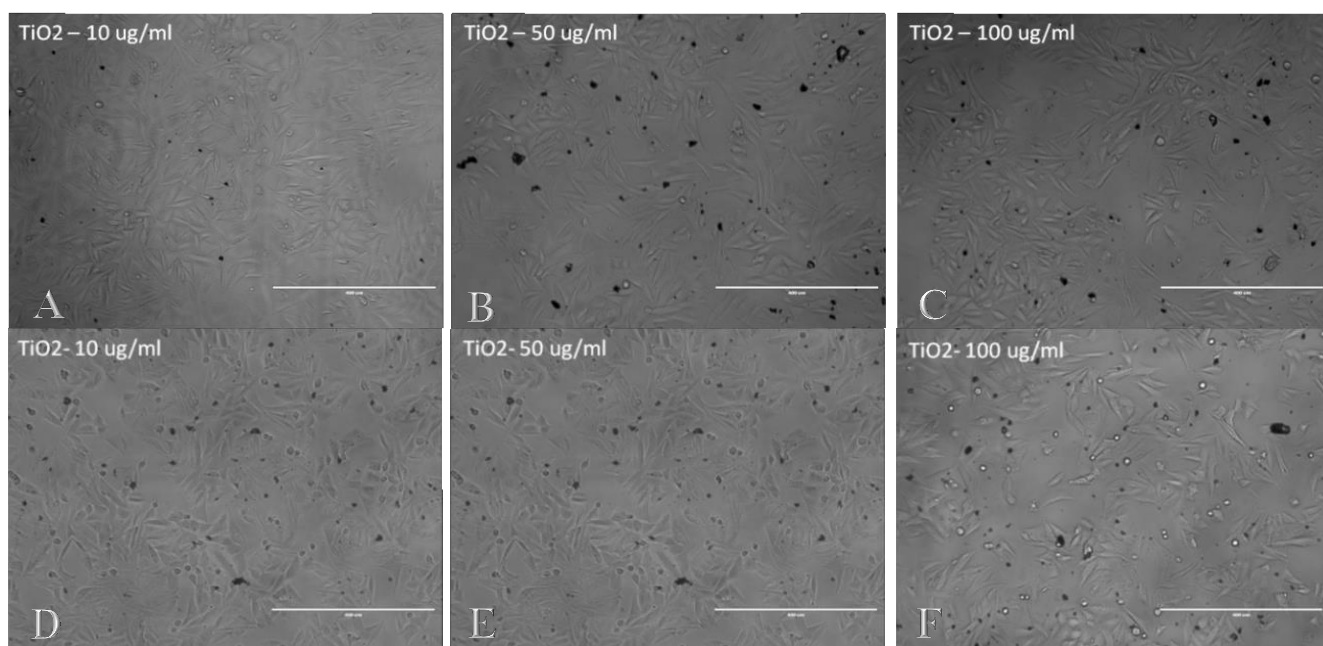


Figura 7:Microscopia de fluorescência do dióxido de Titânio no período de 4 horas (fig.8 A,B e C) e no período de 24 horas (fig.8 D,E e F)

As imagens de microscopia de fluorescência na figura 9 demonstram a não internalização da nanopartículas TiO₂:4Eu, uma vez que houve a formação de aglomerados próximo as células. Contudo, verifica-se uma fluorescência proporcional ao aumento das concentrações utilizadas, 10µg/mL, 50µg/mL e 100 µg/mL. (Fig.9 A, B e C respectivamente). Além disso, as imagens referentes ao tempo de 24 horas mostram um maior número de aglomerados e também maior intensidade da fluorescência. (Fig.9 D, E e F).

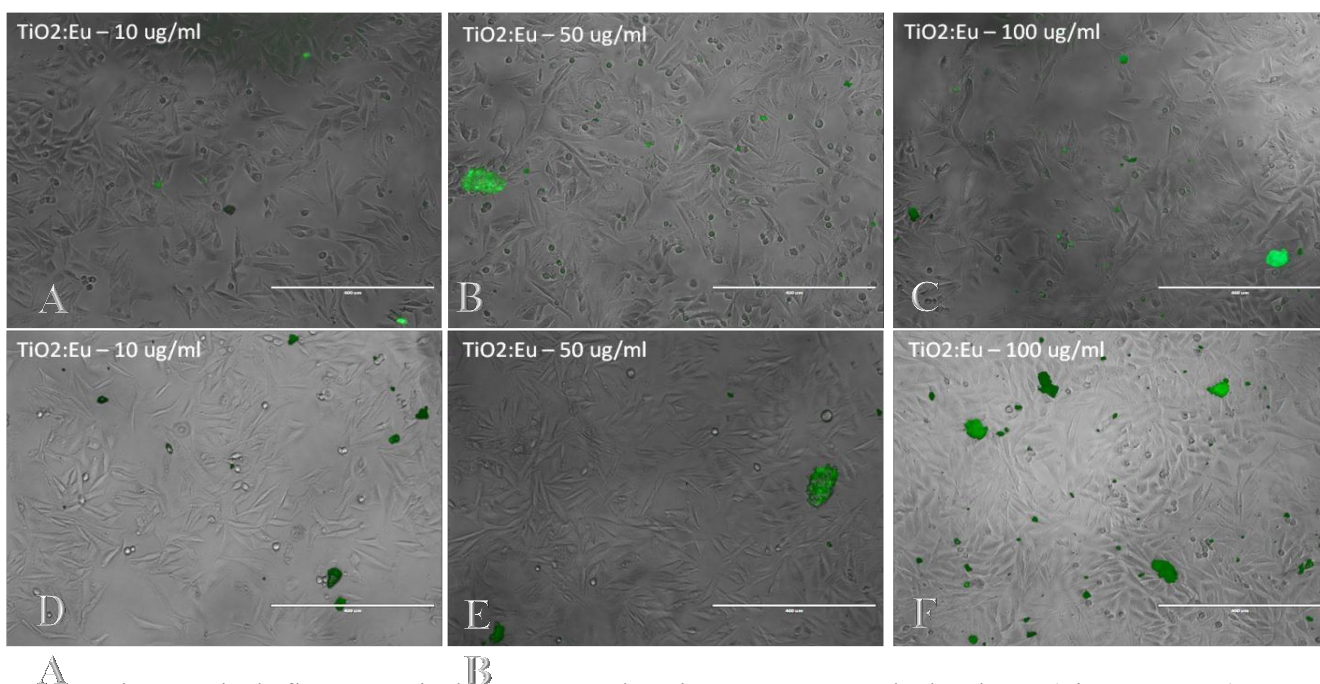


Figura 8:Microscopia de fluorescência da nanopartículas TiO₂: 4Eu no período de 4 horas (Fig. 9 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 9 D,E e F)

Da mesma forma, as células tratadas com TiO_2 : 4Eu:0.5 Ca (Fig. 10) apresentaram baixa fluorescência em especial no período de 4 horas, contudo transcorrido o tempo total nota-se um aumento da fluorescência entre as diferentes concentrações havendo uma diferença contrastante na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 10 F) . Similarmente á imagem anterior, não houve a internalização dos nanocompósitos.

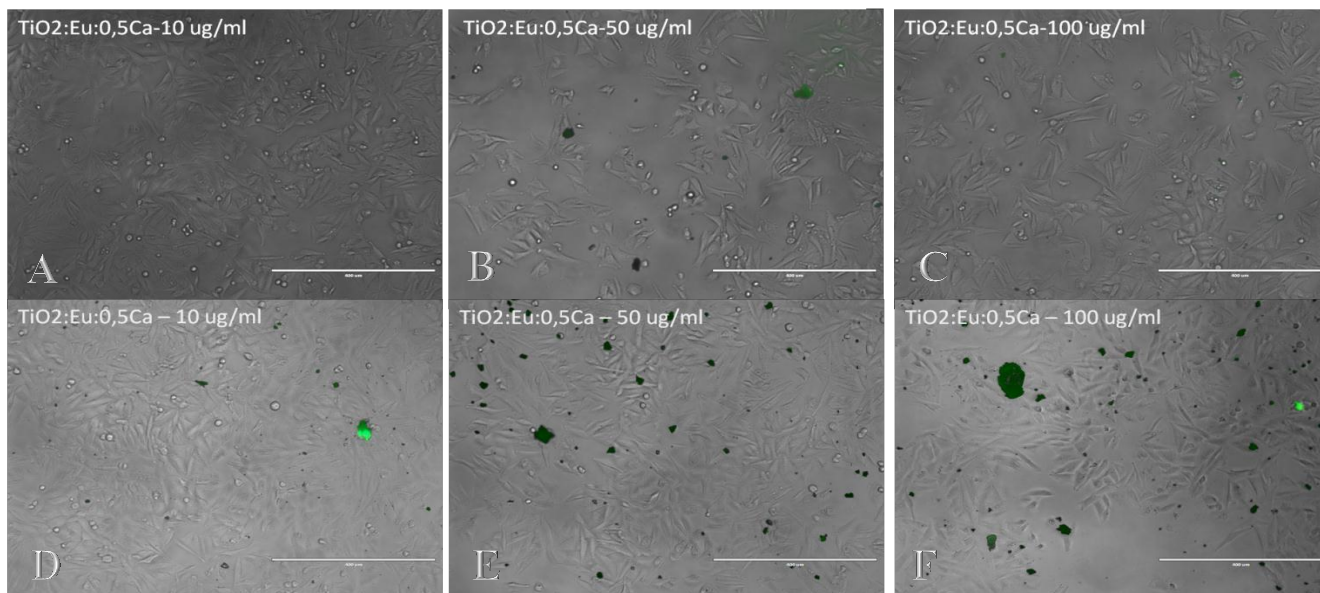


Figura 9:Microscopia de fluorescência do NCs TiO_2 :4Eu:0.5Ca no período de 4 horas (Fig. 10 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 10 D,E e F).

A fluorescência das NPs TiO_2 :4Eu:1 Ca foi identificada no primeiro período de tempo da análise, bem como, nas três concentrações utilizadas. Outra observação importante é a presença de aglomerados em todas as imagens referentes á essa nanopartículas, além disso, verifica-se que as células que incubadas no meio com maior concentração de NPs exibem fluorescência mais intensa, predominantemente no prazo de 24 horas (Fig. 11 F).

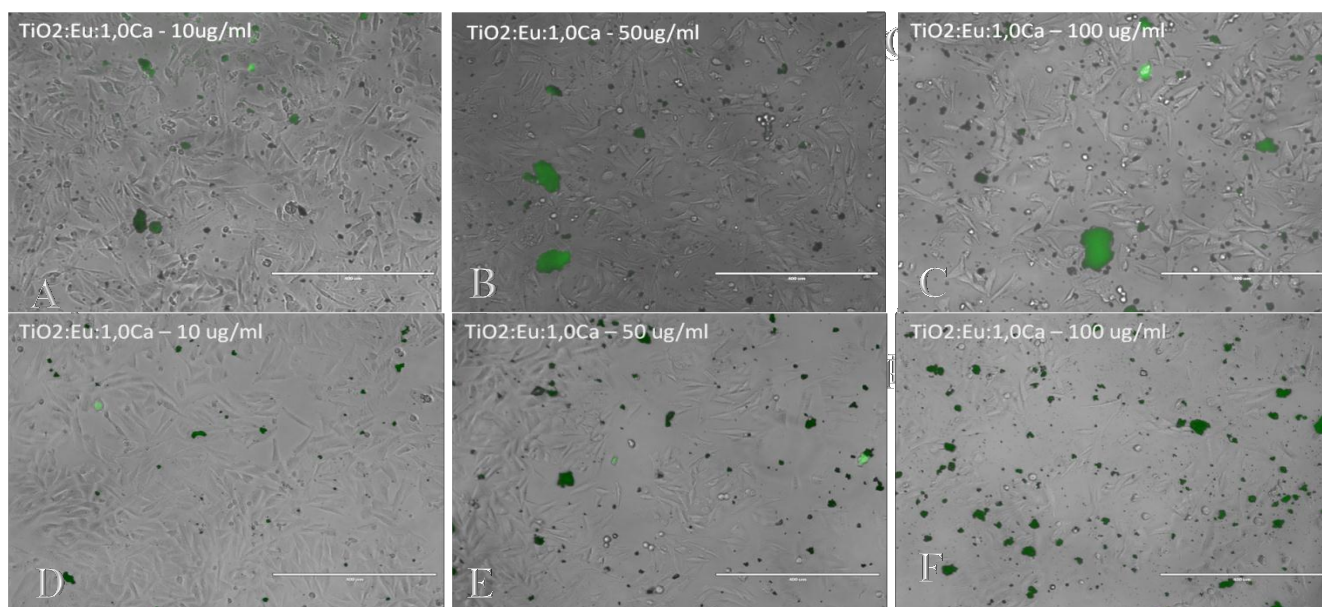


Figura 10:Microscopia de fluorescência do NCs TiO_2 :4Eu: 1Ca no período de 4 horas (Fig. 11 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 11 D,E e F).

O tratamento $\text{TiO}_2\text{:}4\text{Eu:}5\text{Ca}$ (Fig.12) diferentemente dos anteriores demonstrou baixa fluorescência em todos os tempos e concentrações, excetuando a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ durante o período de 04 horas (Fig. 12 A) e a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ no prazo de 24 horas (Fig 12. E). Por outro lado, os agregados mostraram-se com diâmetro inferior aos retratados nas imagens anteriores.

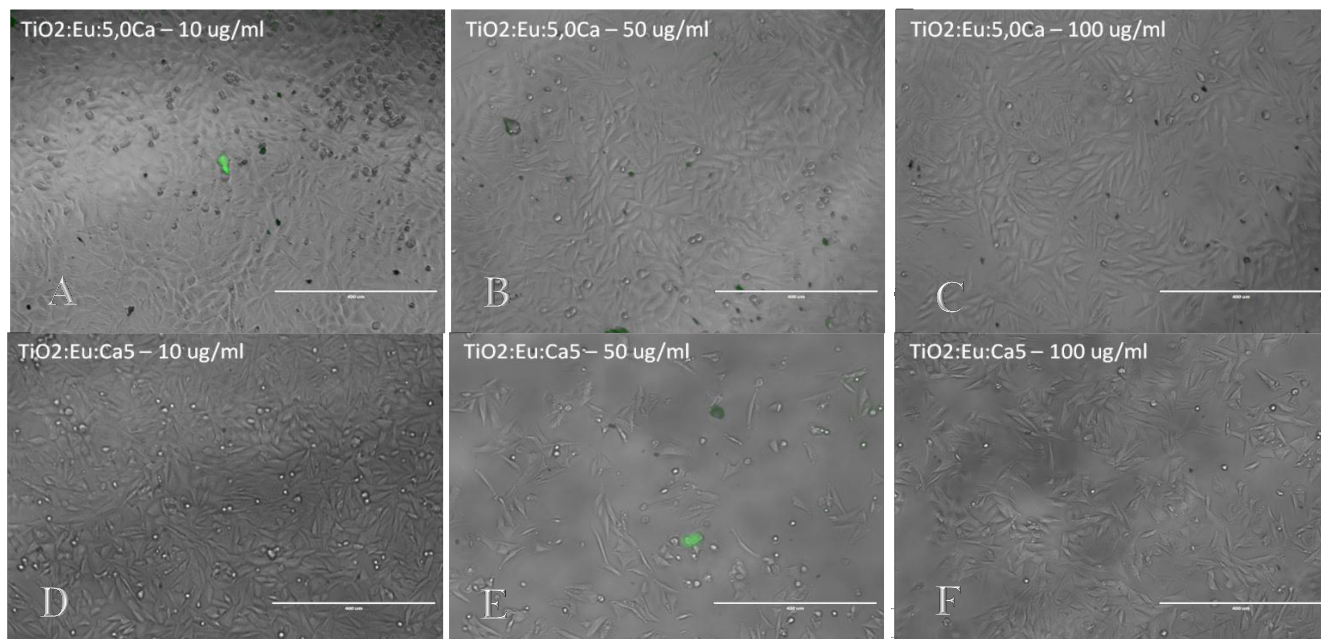


Figura 11:Microscopia de fluorescência da nanopartículas $\text{TiO}_2\text{:}4\text{Eu:}5\text{Ca}$ no período de 4 horas (Fig. 12 A,B e C) e no período de 24 horas (Fig. 12 D,E e F).

Na figura 13 verifica-se que a fluorescência é moderada nas células durante os períodos de tempo pré-estabelecidos para esse ensaio. Aparentemente, não houve a internalização das nanopartículas.

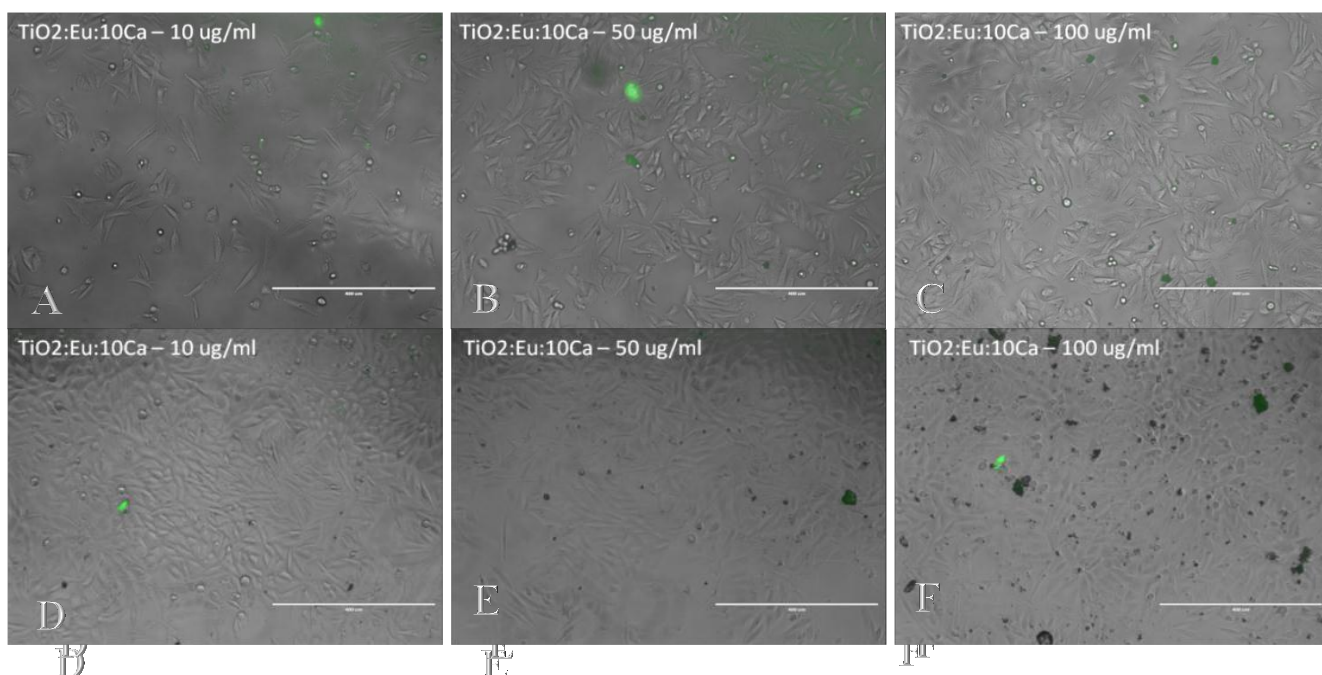


Figura 12:Microscopia de fluorescência do NCs $\text{TiO}_2\text{:}4\text{Eu:}10\text{Ca}$ no período de 4 horas (Fig. 13 A, B e C) e no período de 24 horas (Fig. 13 D, E e F).

5. Discussão

O presente estudo caracterizou os nanocristais de TiO_2 dopados com Európio e concentrações crescentes de Cálcio (0.5, 1, 5 e 10) como também avaliou a citotoxicidade dessas nanopartículas frente a linhagem celular SAOS-2. Para avaliar a viabilidade dessas nanopartículas, foi feito o ensaio colorimétrico MTT, onde as células foram tratadas com as NPs nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 24 horas. Além disso, foi monitorado o tráfico intracelular através de microscopia de fluorescência durante 4 e 24 horas.

As propriedades físicas foram determinadas com base nos ensaios de difração de raio-X, espectroscopia raman e luminescência. A primeira técnica é utilizada para a determinação da estrutura cristalina e também na detecção de alterações na estrutura devido á dopantes. É importante salientar que essas características dependem dos parametros utilizados no processo de síntese das nanopartículas. (FONSECA FILHO; LOPES, 2013)

A identificação da estrutura cristalina foi determinada através de comparações entre as fichas catalográficas padrão JCPDS (*Joint Committee for Powder Diffraction Studies*) e os dados obtidos experimentalmente no DRX. Assim, os padrões difratográficos evidenciam a predominância da fase cristalina anatase para todas as amostras testadas. Além disso, nenhum composto adicional foi formado durante a síntese.

A espectroscopia Raman é descrita como um método de caracterização que identifica pequenas variações nas características microestruturais em nanomateriais, tais como a existência de fases mistas, discrepâncias estequiométricas, bem como o tipo de possíveis defeitos estequiométricos (GOUADEC, COLOMBAN, 2007; GOLUBOVICET *et al.*, 2008).

Nos difratogramas de Raios-X confirmou-se a formação de nanocristais de TiO_2 na fase anatase e que os íons de Eu e Ca estão incorporados na estrutura cristalina, bem como a formação de Óxido de Cálcio (CaO) para concentrações maiores de 0.5 Ca. Os resultados de Raman confirmam as análises de DRX e demonstram que ao dopar os nanocristais com os íons de Eu e Ca ocorre um rearranjo dos íons diferentemente do que dopar apenas com íons de Eu. Os espectros de luminescência confirmaram também a incorporação de íons de Eu na estrutura cristalina do TiO_2 , e que essa luminescência é alterada com a incorporação de íons de Ca. Assim confirmamos a formação de nanocristais de TiO_2 puros, dopados com Eu e codopados com Ca.

As metodologias vigentes para a determinação da citotoxicidade *in vitro*, consistem em técnicas laboratoriais que verificam as condições celulares por diferentes mecanismos, tais como a incorporação de corantes, inibição da formação de colônias celulares ou ainda através do nível de proliferação celular. Dentre os ensaios, destacam-se o teste de exclusão Azul de Tripán, o ensaio do Vermelho Neutro e também o MTT. (ROGERO *et al.*, 2003)

O ensaio colorimétrico MTT mede a viabilidade celular com base no dano induzido nas mitocôndrias. O princípio deste método é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarelo solúvel em água) à formazan (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água). A escolha por este teste justifica-se pelas características correlatas de rapidez, simplicidade, sensibilidade, reprodutibilidade, precisão na leitura espectrofotométrica, e ainda a possibilidade de análise concomitante de amostras. (LI; SONG, 2007) (COSTA, 2013) (SOUZA, 2014).

Em relação ao modelo celular utilizado, optou-se por uma cultura de osteoblastos de osteossarcoma humano imortalizada (SAOS-2), devido à facilidade de acesso, estabilidade, homogeneidade e por fim, reprodutibilidade dos ensaios. (CZEKANSKA *et al.*, 2013) Além disso, essa linhagem é reconhecida como modelo osteoblástico e também pela capacidade de diferenciação em células maduras similares às ósseas. (BORGHI *et al.*, 2018) Nesse sentido, o presente estudo avaliou um nanomaterial com potencial uso na odontologia devido à incorporação do titânio e do cálcio.

Quanto aos ensaios de viabilidade celular em presença de Dióxido de Titânio fluorescentes e suas variantes dopadas com Cálcio, foi constatado, de modo geral, a ausência de efeito citotóxico, tendo em vista que as nanopartículas foram estatisticamente semelhantes entre si. Porém distintas quanto ao controle positivo. Todavia, observa-se que a amostra $\text{TiO}_2:4\text{Eu}:5\text{Ca}$ mostra-se destoante frente às demais e ao grupamento controle nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Segundo Castro (2018) os resultados podem ter se comportado dessa forma mediante a quantidade dos íons de Európio que por possuírem certa fluorescência, podem vir a interferir na leitura ou até mesmo interagir com os componentes do ensaio. Porém, Wang *et al.* (2011) atentam que os ensaios de MTT e XTT podem sofrer interferência das NPs de TiO_2 pela formação de radicais superóxido, que por sua vez reduzem o sal de tetrazólio, gerando como resultado um falso aumento da viabilidade celular.

Os dados da microscopia sugerem a presença de aglomerados de nanopartículas próximo às células. Tal observação corrobora com os estudos Ribeiro *et al.* (2016) que indicam a capacidade do dióxido de titânio aglomerar na presença de água e em fluidos biológicos. Além disso, Saptarshi *et al.* (2013) justificam que a presença desses grânulos é advinda da interação proteína-nanopartícula. Esta união é fortemente dependente das características físico-químicas das nanopartículas, e influencia a captação e o transporte de nanopartículas na célula. Sua composição consiste em proteínas séricas e aminoácidos essenciais que ao entrar em contato com o meio de cultura modificariam seu tamanho hidrodinâmico, dificultando a sua internalização.

Recentemente, Lopes *et al.* (2016) demonstraram que nanopartículas de TiO_2 com diâmetro de 18 nm são captadas eficientemente pelas células. Contudo, o tamanho das nanopartículas utilizadas não foi avaliado neste estudo, dificultando uma análise conclusiva e que correlacione especificamente qual foi a causa da agregação. Ainda nas imagens referentes à microscopia de fluorescência a morfologia das células utilizadas classificam-se como ligeiramente achatadas, o que atesta a afirmação de que não houve alteração na morfologia celular.

Sendo assim, as nanopartículas utilizadas apresentam baixo perfil citotóxico frente aos osteoblastos imortalizados, podendo ter suas aplicações direcionadas ao campo da odontologia e ortopedia. No entanto, a necessidade de mais pesquisas nesse cenário ainda é vigente, predominante quanto a caracterização dos nanocristais, mecanismos de ação *in vivo* e biodisponibilidade, para que assim, haja eficiência e segurança no uso desses nanomateriais.

6. Conclusão

Os nanocristais de TiO_2 puros, dopados com Eu e codopados com concentrações crescentes de Ca foram sintetizados e caracterizados e demonstraram que não ocasionaram alterações na morfologia da linhagem SAOS-2. Além disso, as nanopartículas cristalinas não apresentaram perfil citotóxico em nenhuma das concentrações testadas. A fluorescência dos nanocristais foi visualizada em todos os ensaios realizados, exceto para o TiO_2 (em todas as concentrações e tempos estabelecidos) e o $\text{TiO}_2:4\text{Eu}:5\text{Ca}$ (nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ durante o período de 4 horas e nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ no prazo de 24 horas). Contudo, ensaios complementares são necessários a fim de observar o sinergismo entre íons dopantes, bem como, a criação de protocolos que evitem a aglomeração dos nanocristais no meio de cultura.

Referências Bibliográficas

AGARWAL, Happy; NAKARA, Amatullah; SHANMUGAM, VenkatKumar. Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 109, p.2561-2572, jan. 2019.

AHAMED, Maqsood et al. Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-14, dez. 2017.

ALBUQUERQUE, J. S. V. et al. Nanopartículas de fosfato de cálcio para aplicações biomédicas. In: Congresso Brasileiro De Engenharia e Ciências Dos Materiais, 2002, Natal. Natal: p. 2009 – 2011. Cbecimat, 2002.

BARRÈRE, Florence; VAN BLITTERSWIJK, Clemens A; GROOT, Klaas de. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **International Journal Of Nanomedicine**. [s.l.], p. 317-332. 01 set. 2006.

BOLAND, Sonja; HUSSAIN, Salik; BAEZA-SQUIBAN, Armelle. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.641-652, 30 set. 2014..

BORGHI, F. F. et al. Nanostructured Graphene Surfaces Promote Different Stages of Bone Cell Differentiation. **Nano-micro Letters**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.47-59, 17 abr. 2018.

CASTRO, Paloma Soares de. **Estudo da biocompatibilidade das nanopartículas de zno e prata dopados com európio em cultura de células-tronco humanas, células pré-osteoblásticas (mc3t3-e1) e células tumorais da próstata (pc-3)**. 2018. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

CHEN, Xiao-jie et al. Nanotechnology: a promising method for oral cancer detection and diagnosis. **Journal Of Nanobiotechnology**. [s.l.], p. 2-17. 11 jun. 2018.

CHEN, Zhangjian et al. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 226, n. 3, p.314-319, maio 2014.

COSTA, Ângela Daniela Alves da. **Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade populacional**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Biomédica, Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2013.

CZEKANSKA, E. M. et al. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 102, n. 8, p.2636-2643, 6 set. 2013.

DOAK, S.H.; GRIFFITHS, S.M.; MANSHIAN, B.; SINGH, N.; WILLIAMS, P.M.; BROWN, A.P.; JENKINS, G.J.S. Review: confounding experimental considerations in Nanogenotoxicology. *Mutagenesis*, v.24, n.4, p.285–293 (2009).

FONSECA FILHO, Henrique Duarte da; LOPES, Gerson Anderson de Carvalho. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X. **Estação Científica**, Macapá, v. 3, n. 1, p.31-45, jun. 2013.

GOLUBOVIC, A.; SCEPANOVIC, M.; KREMENOVIC, A.; ASKRABIC, S.; BEREC, V.; DOHCEVIC-MITROVIC, Z.; POPOVIC, Z. V. Raman study of the variation in anatase structure of TiO₂ nanopowders due to the changes of sol-gel synthesis conditions. *Journal Sol-gel Science Technology*, v. 49, p. 311-319, 2008.

GOUADEC, G.; COLOMBAN, P. Raman spectroscopy of nanostructures and nanosized materials. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 38, p. 598-603, 2007.

JIN, Jianfeng et al. Ti-GO-Ag nanocomposite: the effect of content level on the antimicrobial activity and cytotoxicity. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 12, p.4209-4224, jun. 2017.

KHANNA, Puja et al. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. **Nanomaterials**. [s.l.], p. 1163-1180. 30 jun. 2015.

KHURSHID, Zohaib et al. Advances in Nanotechnology for Restorative Dentistry. **Materials**. [s.l.], p. 717-731. 16 fev. 2015.

LANDSIEDEL, R.; KAPP, M.D.; SCHULZ, M.; WIENCH, K.; OESCH, F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, 62 potential artifacts and limitations - Many questions, some answers. *Mutation Research*, v.681, p.241–258 (2009).

LI, J.; SONG, L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*, v. 46, p. 593–599, 2007.

LOPES, Viviana R. et al. Dose-dependent autophagic effect of titanium dioxide nanoparticles in human HaCaT cells at non-cytotoxic levels. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.2-13, 22 mar. 2016.

NEEL, Ensanya Ali Abou et al. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. **International Journal Of Nanomedicine**. [s.l.], p. 6371-6394. 08 out. 2015.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v.311, p.622-627 (2006).

NISKA, Karolina et al. Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. **International Journal Of Nanomedicine**. [s.l.], p. 1095-1107. 04 fev. 2015.

PASCHOALINO, Matheus P.; MARCONE, Glauciene P. S.; JARDIM, Wilson F..Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, [S.I.], v. 33, n. 2, p.421-430, 2010.

PINA et al. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. XXV Encontro Nac. de Eng. de Produção – Porto Alegre, RS, Brasil, 29 out a 01 de nov de 2005.

POKROWIECKI, Rafał; PAKA, Krzysztof; MIELCZAREK, Agnieszka. Nanomaterials in dentistry: a cornerstone or a black box?. **Nanomedicine**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.639-667, mar. 2018..

REIS, Érica Melo; ALVES DE REZENDE, Alexandre Azenha; SANTOS, Diego Vilela ; FRANCIELLI DE OLIVERIA, Pollyanna ; NICOLELLA, Heloisa Diniz ; TAVARES, Denise Crispim ; ALMEIDA SILVA, Anielle Christine ; DANTAS, Noelio Oliveira ; SPANÓ, Mário Antônio . Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide SOURCES (amorphous and nanoparticles) using the in VITRO micronucleus test and the IN VIVO wing somatic test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 84, p. 55?63, 2015.

RIBEIRO, A. R. et al. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-11, 29 mar. 2016.

ROGERO, Sizue Ota et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.317-320, jun. 2003.

SANDOVAL, Sergio et al. Europium-Doped TiO₂ Hollow Nanoshells: Two-Photon Imaging of Cell Binding. **Chemistry Of Materials**, [s.l.], v. 24, n. 21, p.4222-4230, 16 out. 2012.

SAPTARSHI, Shruti R; DUSCHL, Albert; LOPATA, Andreas L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.26-38, 19 jul. 2013.

SOUZA, Cássia Cabral e. **Aplicação dos ensaios Salmonella/microsoma e MTT para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e fotocátalise**. 2014. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

SYAMA, S. et al. Zinc oxide nanoparticles induced oxidative stress in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Toxicology Mechanisms And Methods*, [s.l.], v. 24, n. 9, p.644-653, 3 set. 2014.

WANG, Jiang-xue et al. TiO₂ nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection. **Biomaterials**, [s.l.], v. 30, n. 27, p.4590-4600, set. 2009.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *ToxicolIn Vitro*, v. 25, n. 8, p. 2147- 2151, 2011.

WEBSTER, Thomas J.; AHN, Edward S..Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineering Bone. **Tissue Engineering** **12**, [s.l.], v. 103, p.275-308, jun. 2006.

WINKLER, Hans Christian et al. Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.2-19, 1 jun. 2018.

ZENG, Haifeng et al. Synthesis of Europium-Doped Fluorapatite Nanorods and Their Biomedical Applications in Drug Delivery. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.753-760, 6 maio 2017.

ZHANG, Yilin et al. Analysis of the cytotoxicity of differentially sized titanium dioxide nanoparticles in murine MC3T3-E1 preosteoblasts. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 8, p.1933-1945, 18 jun. 2011.

ZHAO, Jinshun; LIU, Kui; LIN, Xialu.Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], p.2509-2520, jul. 2013.