

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização físico-química de nanocristais de TiO_2 puros tratados com diferentes temperaturas e avaliação da atividade antioxidante do mesmo associado a geleia real

Vinicius Prado Bittar

Monografia apresentada à Coordenação 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 físico-química de nanocristais de TiO_2 puros tratados com diferentes temperaturas e avaliação da atividade antioxidante do mesmo associado a geleia real

Vinicius Prado Bittar

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

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 físico-química de nanocristais de TiO_2 puros tratados com diferentes temperaturas e avaliação da atividade antioxidante do mesmo associado a geleia real

Vinicius Prado Bittar

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Homologado pela coordenação do curso de
biotecnologia em __/__/__

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização físico-química de nanocristais de TiO_2 puros tratados com diferentes temperaturas e avaliação da atividade antioxidante do mesmo associado a geleia real

Vinicius Prado Bittar

Aprovado pela banca examinadora em: / / Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a Deus por todos os dias me dar a oportunidade de aprender com meus erros e meus acertos, e com esse aprendizado não só ter uma melhor qualidade de vida, mas sempre buscar ser uma pessoa melhor.

Eu gostaria de agradecer aos meus pais por me apoiarem e me darem suporte em todas as minhas escolhas, e por me ajudarem em todos os meus momentos difíceis.

Eu gostaria de agradecer a minha namorada Ana Luiza Silva Borges por me incentivar a continuar, jamais desistir e sempre me mostrar o lado positivo de cada situação. por mais difícil que seja o momento que nos encontramos.

Eu gostaria de agradecer a toda a equipe do LABIBI por sempre me ajudar nos meus experimentos e tirar minhas dúvidas.

Eu gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, ao Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas, a Prof.^a Dr.^a Anielle Christine Almeida Silva e a Prof.^a Dr.^a Renata Roland Teixeira por terem me dado a oportunidade de trabalhar no laboratório de bioquímica e de física de materiais.

Resumo

É de fato científico que o estresse oxidativo pode causar diversas doenças no organismo, isso faz com que aumente a necessidade de compostos antioxidantes, capazes de inibir a oxidação das células e consequentemente inibir a morte celular e não trazer malefícios para o organismo. O desenvolvimento de novos compostos e fármacos a base de nanopartículas teve um aumento significativo nos últimos tempos, dando maior ênfase na área da nanotecnologia relacionada a medicina. De acordo com esses fatos, a utilização de nanopartículas pode ser um novo meio promissor antioxidante para as células que sofrem estresse oxidativo, atuando como um inibidor de oxidação no organismo, mas para realizar tal feito, novos estudos com nanopartículas precisam ser realizados para elucidar seu real mecanismo no organismo. O presente estudo teve como objetivo estudar os nanocristais de TiO_2 puros tratados em diferentes temperaturas e analisar sua capacidade antioxidante em comparação com a geleia real.

Palavras-chave: Nanopartículas, estresse oxidativo e geleia real.

Abstract

It is indeed scientific that oxidative stress can cause various diseases in the body, this increases the need for antioxidant compounds, capable of inhibiting the oxidation of cells and consequently inhibit cell death and do not bring harm to the body. The development of new compounds and drugs based on nanoparticles has increased significantly in recent times, giving greater emphasis in the area of nanotechnology related to medicine. According to these facts, the use of nanoparticles may be a promising new antioxidant medium for cells that undergo oxidative stress, acting as an oxidation inhibitor in the body, but to accomplish such a feat, further studies with nanoparticles need to be performed to elucidate their mechanism in the body. The present study aimed to study the pure TiO₂ nanocrystals treated at different temperatures and to analyze their antioxidant capacity in comparison with the royal jelly.

Key words: Nanoparticles, oxidative stress and royal jelly.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Nanopartículas: pequenos tamanhos e grandes possibilidades.....	1
1.2. Conhecendo os processos Bioquímicos.....	2
1.3. Sistema Imunológico.....	6
1.4. Nanopartículas associadas a agentes antioxidantes.....	7
1.5. Geleia Real: fatos científicos, teorias e associação com Dióxido de Titânio...8	
2. Objetivos.....	8
2.1. Objetivos Específicos.....	9
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Nanocristais de TiO ₂ puros.....	9
3.2. Difração de raios-x (DRX).....	9
3.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	10
3.4. Espectroscopia Raman.....	11
3.5. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	12
3.6. Método de Solvatação.....	13
3.7. Método de Bradford.....	13
3.8. Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	13
3.9. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC).....	14
3.10. Método do sequestro do radical DPPH (DPPH).....	15
3.11. Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP).....	15
3.12. Teste de produção de Espécies Reativas em Macrófagos.....	16
3.13. Análises Estatísticas.....	17
4. Resultados e Discussão.....	17
4.1. Varredura de Microscopia Eletrônica (MEV).....	17
4.2. Difração de Raio X.....	23
4.3. Espectroscopia Raman.....	25
4.4. Método de Bradford.....	27
4.5. Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP).....	27
4.6. Método do sequestro do radical DPPH (DPPH).....	31
4.7. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC).....	36
4.8. Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	39
4.9. Teste de produção de Espécies Reativas em Macrófagos.....	44
5. Conclusão.....	49
6. Referências Bibliográficas.....	50

Lista de Figuras

Figura 1. Comparação entre o microscópio óptico e o microscópio eletrônico de varredura.....	11
Figura 2. Explicação do equipamento de microscopia de Força Atômica....	12
Figura 3. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 500°C analisada a 10µm.....	18
Figura 4. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 500°C analisada a 2µm.....	18
Figura 5. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 500°C analisada a 1µm.....	19
Figura 6. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 650°C analisada a 10µm.....	20
Figura 7. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 650°C analisada a 2µm.....	20
Figura 8. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 650°C analisada a 1µm.....	21
Figura 9. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 800°C analisada a 10µm.....	22
Figura 10. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 800°C analisada a 2µm.....	22
Figura 11. Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO ₂ tratada a 800°C analisada a 1µm.....	23
Figura 12. Padrões de Difração de Raio X das amostras submetidas a recozimento termal.....	24
Figura 13. Característica estrutural das nanopartículas de TiO ₂ na forma anatase, rutila e brokita.....	25
Figura 14. Espectroscopia Raman das nanopartículas de TiO ₂ submetidos ao recozimento térmico.....	26
Figura 15. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 500°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe ³⁺ para Fe ²⁺	27
Figura 16. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 500°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe ³⁺ para Fe ²⁺	27
Figura 17. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 650°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe ³⁺ para Fe ²⁺	28
Figura 18. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 650°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe ³⁺ para Fe ²⁺	28
Figura 19. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 800°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe ³⁺ para Fe ²⁺	28

Figura 20. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 800°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe^{3+} para Fe^{2+} 28

Figura 21. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe^{3+} para Fe^{2+} 29

Figura 22. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 650°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe^{3+} para Fe^{2+} 30

Figura 23. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 800°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe^{3+} para Fe^{2+} 30

Figura 24. Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....32

Figura 25. Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....32

Figura 26. Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 650°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....33

Figura 27. Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 650°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....33

Figura 28. Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 800°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....33

Figura 29. Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 800°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....33

Figura 30. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....34

Figura 31. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 650°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....35

Figura 32. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 800°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....35

Figura 33. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil.....37

Figura 34. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 500°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil.....	37
Figura 35. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 650°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil.....	37
Figura 36. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 650°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil.....	37
Figura 37. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 800°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil.....	38
Figura 38. Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO ₂ tratada a 800°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil.....	38
Figura 39. Estrutura molecular da fluoresceína.....	38
Figura 40. Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.....	39
Figura 41. Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.....	40
Figura 42. Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.....	41
Figura 43. Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.....	42
Figura 44. Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.....	43
Figura 45. Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.....	44
Figura 46. Histograma comparativo entre as amostras de TiO ₂ tratadas a 500°C isoladas ou em conjunto com o zymosan.....	45
Figura 47. Histograma comparativo entre as amostras de TiO ₂ tratadas a 650°C isoladas ou em conjunto com o zymosan.....	45
Figura 48. Histograma comparativo entre as amostras de TiO ₂ tratadas a 800°C isoladas ou em conjunto com o zymosan.....	46
Figura 49. Análise de microscopia de força atômica do reagente Zymosan isolado.....	47
Figura 50. Análise de microscopia de força atômica das nanopartículas de TiO ₂ isoladas.....	47

Figura 51. Análise de microscopia de força atômica do reagente Zymosan combinado com as nanopartículas de TiO_2 48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise química molecular da amostra de TiO_2 tratada a temperatura de 500°C 19

Tabela 2. Análise química molecular da amostra de TiO_2 tratada a temperatura de 650°C 21

Tabela 3. Análise química molecular da amostra de TiO_2 tratada a temperatura de 800°C 23

Tabela 4. Tamanho e porcentagem das nanopartículas de TiO_2 em anatase, rutila e brokita, submetidos a recozimento termal.....25

1. Introdução

Os constantes avanços na medicina e tecnologia ajudam e melhoram constantemente a qualidade e expectativa de vida de diversas pessoas portadoras de diferentes patologias. Entretanto, ainda existe muito a se desvendar para que esse caminho entre as doenças que acometem os humanos e a medicina, se cruzem, isso inclui descobrimento de novos fármacos, novos diagnósticos, e possíveis tratamentos de acordo com a necessidade do paciente em questão (ANDR e colab., 2016).

Nos dias atuais, a nanotecnologia está presente em diversas áreas, sendo utilizada constantemente e se adaptando ao longo do tempo com a utilização de nanopartículas. A ciência está fazendo o uso da nanotecnologia e seus produtos para diferentes finalidades, tais como na biologia celular e molecular no diagnóstico de doenças, na ciência dos biomateriais, como o desenvolvimento de nanotubos de carbono, na produção de biossensores, no desenvolvimento de cosméticos e na medicina com novas propostas de tratamentos e diagnósticos de patologias (HSIAO e colab., 2016).

A utilização dessas nanopartículas na área da saúde vem chamando bastante atenção em relação a sua capacidade de aplicação em diagnóstico e tratamento de doenças, pois se mostraram bastante promissoras e eficazes em diferentes aspectos. A nanotecnologia acabou convergindo com a medicina, dando origem a nanomedicina, que mescla os efeitos das características físicas e químicas das nanopartículas na área medicinal (HSIAO e colab., 2016).

1.1. Nanopartículas: pequenos tamanhos e grandes possibilidades

As nanopartículas possuem um tamanho um tanto quanto característico, podendo variar de 1-100nm, devido a esse fato elas possuem a capacidade de absorver uma quantidade relativamente alta de fármacos no geral, podendo atuar como carreadora dos mesmos para o organismo, pois devido ao seu tamanho, pode facilmente circular na corrente sanguínea e penetrar na membrana plasmática das células (HSIAO e colab., 2016).

Sua grande superfície de contato confere e melhora as características físicas e químicas dessas nanopartículas, sendo assim constantemente estudadas. Tais características são: mecânicas, magnéticas, catalíticas e ópticas (SUN e colab., 2017).

O dióxido de titânio (TiO_2) foi descoberto em 1795 e sua produção comercial se deu início em 1920. É um composto inorgânico que pode ser encontrado em 3 formas cristalinas diferentes, anatase, rutila e brokita (RAHIMI e colab., 2016).

O dióxido de titânio (TiO_2) é um semicondutor (KAMAT, 2012) utilizado em diversas áreas como, por exemplo, aditivo em cosméticos (RAHIMI e colab., 2016), bateria de lítio, (CHEN, Nan e colab., 2012; WANG e colab., 2011) degradação de poluentes em água (CAPPELLETTI e colab., 2009) e, principalmente, na fotocatalise (MAIRA e colab., 2001; ZHANG e colab., 2006).

O TiO_2 tem a propriedade de atuar tanto como um agente oxidante, como um agente redutor, a característica oxidante é interessante na oxidação da matéria orgânica, já a redutora para remoção de metais dissolvidos na água, como níquel, cádmio e chumbo. Essas propriedades são fortemente influenciadas pela fase cristalina, tamanho, dopagens, morfologia da superfície e interface. Em relação a fase cristalina a rutila é menos fotoativa que a anatase ou até mesmo pode não possuir atividade fotocatalítica (SUN e colab., 2017).

Existem diferentes técnicas para determinar a espessura e as características das nanopartículas, como por exemplo a varredura de microscopia eletrônica, a difração de raio-X e a espectroscopia Raman (POLIM, 2007).

Embora a grande maioria dos estudos de fotocatalise utilizando TiO_2 visa à área tecnológica, esse material em escala nanométrica pode apresentar diversas vantagens na área médica, biológica e química (MAURICIO e colab., 2018).

1.2. Conhecendo os processos Bioquímicos

As células anaeróbias conseguem obter energia (ATP) através da fermentação, degradando a glicose na ausência do oxigênio. Já em células eucarióticas, a etapa da glicólise é apenas a primeira para oxidação completa da glicose. Na respiração aeróbica, o piruvato produzido pela glicólise é oxidado posteriormente a moléculas de água (H_2O) e gás carbônico (CO_2). Essa etapa de utilização do oxigênio no catabolismo celular é denominada de respiração. Em um sentido mais amplo, respiração celular consiste basicamente em consumo de oxigênio (O_2) e produção de gás carbônico (CO_2) (NELSON e COX, 2013).

A respiração celular acontece em três estágios principais. O primeiro estágio, diferentes moléculas orgânicas atuando como combustíveis, moléculas como carboidratos e aminoácidos são oxidadas para produzirem moléculas de dois carbonos no formato do grupo químico acetila para obtenção da molécula de Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA) (NELSON e COX, 2013).

Na segunda etapa da respiração celular, os grupamentos químicos acetil formados serão oxidados a gás carbônico (CO_2). Essa oxidação é realizada através de ações enzimáticas, e a energia liberada na reação será capturada pelos transportadores de elétrons nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) e flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), porém estarão em sua forma reduzida NADH e FADH_2 (NELSON e COX, 2013).

No terceiro estágio da respiração celular, as moléculas de NADH e FADH_2 sofrerão oxidação, doando prótons H^+ e elétrons livres. A molécula de oxigênio irá atuar na respiração celular como um aceptor de elétrons, logo, os elétrons doados pelas moléculas serão transferidos ao oxigênio, através da cadeia respiratória (cadeia transportadora de elétrons). O objetivo da respiração celular é a obtenção de energia em forma de trifosfato de adenosina (ATP). Durante a transferência de elétrons para o oxigênio, a energia liberada é armazenada em forma de ATP, através de um processo denominado Fosforilação Oxidativa (NELSON e COX, 2013).

A fosforilação oxidativa é o final do metabolismo em organismos aeróbios, onde a energia gerada pela oxidação de moléculas como carboidratos, gorduras e lipídeos vão promover a síntese de ATP. Essa etapa ocorre na mitocôndria. Existem diversas moléculas carregadoras de elétrons ligadas a membrana, são elas: nicotina-adenina-dinucleotídeo (NAD), flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), citocromos, quinona hidrofóbica (ubiquinona) e proteína ferro-enxofre (NELSON e COX, 2013).

Os carregadores de elétrons atuam em complexos enzimáticos diferentes. O complexo I e II tem a função de catalisar a transferência de elétrons para a ubiquinona. Essa transferência é realizada por dois doadores de elétrons, o NADH e o succinato. O complexo III carrega os elétrons da ubiquinona já em seu estado reduzido para o citocromo c, e por fim o complexo IV transfere os elétrons do citocromo c para o oxigênio (O_2) (CHEN, Qun e colab., 2003).

A fosforilação oxidativa leva a produção de espécies reativas de oxigênio, os chamados radicais livres. Diversas etapas da fosforilação oxidativa na mitocôndria tem a capacidade de reduzir a molécula de oxigênio e produzir radicais livres altamente reativos (NELSON e COX, 2013). A ubiquinona pode receber dois elétrons para formar o ubiquinol (QH_2). O complexo

enzimático I e II pode passar elétrons livres para o ubiquinol, e o mesmo pode transferir elétrons para o complexo III, essa transferência de elétrons é feita através de um radical intermediário, a ubiquinona reduzida ($Q^{\cdot-}$). A ubiquinona reduzida tem a capacidade de passar um elétron para a molécula de oxigênio, formando $O_2^{\cdot-}$ (CHEN, Qun e colab., 2003).

Os radicais livres estão envolvidos em diversos processos tanto no organismo como em doenças, como no câncer, envelhecimento e inflamações, logo durante vários anos os radicais livres estão sendo estudados a fundo para se saber o seu verdadeiro papel e sua função (A.L.A. FERREIRA, 2002).

Radical livre é um átomo altamente reativo que possui número ímpar de elétrons em sua última camada de valência, devido a esse não-emparelhamento dos elétrons na última camada, a molécula ou átomo se torna altamente reativo (A.L.A. FERREIRA, 2002; NAITO, 2002). Uma reação de redução significa o ganho de elétrons, e a reação de oxidação significa a perda de elétrons (OLIVEIRA e colab., 2016).

Os radicais livres são formados através de reações de óxido-redução e podem ser chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são formadas por todo o organismo, algumas delas são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERNANDO e CHAVES, 2017).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio em seu estado fundamental, o mesmo é principalmente formado na etapa da cadeia respiratória (TONIOLLI e COSTA, 2017). É pouco reativo e não possui a capacidade de penetração pela membrana lipídica, agindo apenas onde é produzido, na membrana mitocondrial (C. D. SCHNEIDER & A, R, 2004; FERNANDO e CHAVES, 2017).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a partir da ligação de outra molécula de oxigênio e dois íons de hidrogênio no superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (C. D. SCHNEIDER & A, R, 2004). Possui vida longa e alta capacidade de difusão em sistemas biológicos, sendo considerado altamente tóxico para as células. (FERNANDO e CHAVES, 2017)

O radical Hidroxila ($OH^{\cdot}$) é formado quando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) recebe mais um elétron e um íon hidrogênio (C. D. SCHNEIDER & A, R, 2004). É considerada a mais reativa em sistemas biológicos, é bastante energético, possui meia vida curta e consegue atravessar membranas, reagindo com lipídeos e o DNA (FERNANDO e CHAVES, 2017).

Nos últimos anos, os metais tomaram bastante atenção no meio científico em relação a sua capacidade de catalisar reações de formação de radicais livres e consequentemente induzir o estresse oxidativo (A.L.A. FERREIRA, 2002).

O radical Hidroxila pode ser formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com íons de ferro ou cobre, a mesma é denominada de Reação de Fenton. O radical Hidroxila pode também ser formado a partir da reação de Haber-Weiss, que consiste na reação de uma molécula de H_2O_2 e O_2^- (C. D. SCHNEIDER & A, R, 2004; FERNANDO e CHAVES, 2017).

O excesso dessas espécies reativas de oxigênio no organismo é prejudicial para o sistema, e pode levar ao estresse oxidativo (A.L.A. FERREIRA, 2002).

O estresse oxidativo pode ser caracterizado como um desbalanço entre espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante do organismo, onde ocorre um aumento excessivo de espécies reativas e o sistema antioxidante do organismo não consegue combater essas espécies danosas ao organismo (T.HUSSAIN,BIETAN, Y.YIN, F.BLACHIER, 2016).

O estresse oxidativo pode causar danos sérios, pois reagem com enzimas, lipídeos de membrana provocando a peroxidação lipídica e oxidam moléculas de DNA, logo é um distúrbio relativamente perigoso para o organismo, caso não seja controlado e revertido a tempo (TÚLIO e CAMPOS, 2017).

Os lipídeos são um grupo de compostos quimicamente variados, cuja característica em comum entre todos que os define, é que são insolúveis em água. Os lipídeos possuem diversas funções biológicas. Gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos, os fosfolipídeos e os esteróis tem a função de dar estrutura a membrana biológica, outros lipídeos encontrados em menores quantidades possuem funções de: serem cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos fotossensíveis, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros celulares (A. J. HULBERT, NICOLAS MARTIN, 2017; NELSON e COX, 2013).

É fato que os radicais livres em altos níveis causam danos as macromoléculas celulares, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos. Os lipídeos da membrana são altamente susceptíveis a oxidação dos radicais livre, levando a peroxidação lipídica (OLIVEIRA e colab., 2016).

A peroxidação lipídica pode alterar a fluidez e a permeabilidade da membrana, fazendo com que comprometa os processos metabólicos ideais do organismo em questão. Quando os

lipídeos são degradados, ocorre aumento dos níveis de malonaldeído (MDA) no organismo, que é um produto da peroxidação lipídica. Essa substância é usada como marcador para medir os níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo no organismo (A. J. HULBERT, NICOLAS MARTIN, 2017; OLIVEIRA e colab., 2016).

Existem algumas enzimas que auxiliam na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, diferentes formas da enzima superóxido-dismutase, que catalisam a reação de formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através do ânion superóxido (O_2^-), para posteriormente a enzima glutathione-peroxidase atuar inibindo a ação do peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias e a enzima catalase inibir o peróxido de hidrogênio nos lisossomos (ESRA BIRBEN, UMIT MURAT SAHINER, CANSIN SACKESEN, SERPIL ERZURUM, 2012; SCANDALIOS, 2005).

O método mais utilizado frequentemente para investigação de estresse oxidativo e consequente peroxidação lipídica é o método de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). O protocolo do TBARS quantifica o estresse oxidativo através da medição de dano peroxidativo nos lipídeos, que ocorre através da formação de radicais livres (GHANI e colab., 2017; VALKO e colab., 2016).

Radicais livres causam a peroxidação lipídica, que geram moléculas que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições de altas temperaturas, uma dessas moléculas é o malondialdeído, que reage com o TBA e forma um dímero de cor rosa. A medida e quantificação dos danos do estresse oxidativo pode ser medido por fluorometria (GHANI e colab., 2017; VALKO e colab., 2016).

1.3. Sistema Imunológico

O sistema imunológico é constituído por uma organização de células e moléculas que podem desencadear dois tipos de resposta imune, a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (WILSON DE MELO CRUVINEL, 2010).

A resposta imune adaptativa, se baseia na ação antígeno-específica de células T e células B, onde uma vez ativadas contra um antígeno essas células são capazes de reconhecê-lo em infecções futuras semelhantes. Já a resposta imune inata é caracterizada como sendo a primeira defesa do organismo contra agentes patogênicos, onde estão envolvidos fagócitos como

macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células *Natural Killers* (NK) e células responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios (NOGUEIRA, 2018).

As células fagocíticas são células especializadas na fagocitose de resíduos celulares, de células apoptóticas, de bactérias e vírus ou partículas exógenas estranhas ao corpo. Os macrófagos são células que fazem parte do sistema fagocitário do organismo e desempenham importantes papéis na defesa do hospedeiro, pois tem a capacidade de remover células mortas, detritos e patógenos, através do processo de fagocitose, consegue moldar a resposta inflamatória através da secreção de fatores que formam a imunidade adaptativa (citocinas e enzimas) e possui a capacidade de apresentar antígenos ao linfócito T (A.C, 2016).

É fato que a inflamação pode estar relacionada com um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, e pesquisas mostram que os macrófagos produzem e liberam espécies reativas de oxigênio, para dar suporte para o organismo eliminar determinada infecção bacteriana ou viral e conseguir inibir o patógeno (LE MOAL e colab., 2018).

1.4. Nanopartículas associadas a agentes antioxidantes

As nanopartículas podem ter efeitos benéficos em relação a doenças que promovem estresse oxidativo, logo estão tomando bastante a atenção de pesquisas atuais. Existem diversas doenças que promovem como efeito adverso o estresse oxidativo, logo um melhor mecanismo de defesa e reversão desse problema, iria auxiliar no possível tratamento de alguma respectiva doença, para que o organismo não sofra tanto os efeitos negativos do estresse oxidativo (SUN e colab., 2017).

A atividade antioxidante de nanomateriais e produtos naturais em processos biológicos é muito importante uma vez que várias patologias estão associadas ao desbalanço do estresse oxidativo no organismo. O aumento das espécies reativas de oxigênio no organismo pode causar danos celulares que prejudicam o funcionamento das células/tecidos. Produtos com atividade antioxidante podem potencializar as defesas antioxidantes do organismo e minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo (CAMBRUSSI e colab., 2018).

1.5. Geleia Real: fatos científicos, teorias e associação com Dióxido de Titânio

A geleia real é produzida pelas glândulas hipofaríngea e mandibular de abelhas operárias nutridoras (*Apis mellífera* L.) e possui várias atividades biológicas, incluindo atividades antimicrobiana, antialérgica, anti-inflamatória, anti-estresse e antioxidante (PAVEL e colab., 2011).

A geleia real é composta por diversos componentes biológicos importantes e que possuem potencial para auxiliar na manutenção da saúde, como proteínas, lipídeos, açúcares, minerais e aminoácidos livres, possuem também vitaminas como riboflavina, tiamina, niacina, ácido fólico e biotina, possui também pequenas quantidades de vitamina C, D, A, e E (KHAZAEI e colab., 2018).

Os minerais que compõem a geleia real são basicamente: cálcio, sódio, potássio, cobre, ferro, zinco e manganês. O composto bioativo principal da geleia real é o ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico, que é um ácido graxo insaturado encontrado apenas na geleia real em toda a natureza. A atuação da geleia real em determinado organismo, depende em que célula ela irá atuar (KHAZAEI e colab., 2018).

A geleia real tem recebido bastante atenção ultimamente devido ao seu forte potencial antioxidante e potente eliminador de radicais livres. Pesquisas recentes comprovam que a geleia real pode eliminar tanto radicais livres quanto também radicais superóxidos, radicais hidroxilas e DPPH (PASUPULETI e colab., 2017).

Em pesquisas, a geleia real também mostrou ter uma forte proteção contra estresse oxidativo em tecido hepático e renal expostos a tetracloreto de carbono e cisplatina. Este efeito foi descoberto devido ao decaimento da produção de MDA e aumento na atividade do sistema enzimático antioxidante do organismo, como a glutatona redutase, glutatona peroxidase e superóxido desmutase (KHAZAEI e colab., 2018).

A associação de nanopartículas com atividade antioxidante a esse produto natural, poderia potencializar os efeitos biológicos já apresentados.

O desenvolvimento de novos nanomateriais com aplicações médicas e biológicas vêm sendo amplamente investigado. O TiO_2 é um semicondutor bastante utilizado na área fotocatalítica devido seu alto poder oxidativo ou redutor, contudo, esses efeitos são pouco reportados na área biológica. Assim, neste trabalho, foi investigado as suas propriedades físico-químicas e atividade antioxidante. Além disso, investigamos a sua interação com a geleia real.

2. Objetivos

Neste trabalho foi investigado as propriedades físico-químicas de nanopartículas de dióxido de titânio puros tratados a diferentes temperaturas (500°C, 650°C e 800°C) e foi estudada a atividade antioxidante dessas nanopartículas isoladas e associadas a geleia real.

2.1. Objetivos Específicos

- Realizou-se caracterizações físico-químicas dos nanocristais de TiO₂ puros.
- Utilizou-se técnica de difração de Raio X, Varredura de Microscopia Eletrônica e Espectroscopia Raman.
- Investigou-se as interações entre as nanopartículas de dióxido de titânio e a geleia real.
- Realizou-se ensaios para avaliação da atividade antioxidante dessas nanopartículas isoladas e associadas a geleia real.

3. Material e Métodos

3.1. Nanocristais de TiO₂ puros

Os nanocristais de TiO₂ puros foram sintetizados e processados no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia em colaboração com o Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas e a Prof.^a Dr.^a Anielle Christine Almeida Silva.

O dióxido de titânio é um semicondutor de larga “*bandgap*” (3.0eV para rutila e 3.2eV para anatase) e possui alta estabilidade fotoquímica. É um material polimórfico com três formas alotrópicas denominadas, anatase, rutila e brokita (ARAÚJO e colab., 2018).

Neste trabalho foram utilizados nanocristais de TiO₂ com diferentes tratamentos térmicos, 500°C, 650°C e 800°C.

3.2. Difração de raios-x (DRX)

A técnica de Difração de Raio X (DRX) é indicada para determinar fases cristalinas de amostras sólidas. É uma técnica que através dela pode se obter diversas informações sobre o

material, como por exemplo, o tipo de fase cristalográfica nas amostras, permitindo ter uma análise concisa da amostra em questão.

Neste método, o plano cristalino do material analisado irá atuar refratando o feixe de luz óptico. Ao incidir feixes de raios X na amostra cristalina, irá ocorrer interferências construtivas e destrutivas de raios X difratados. As interferências destrutivas vão ser eliminadas, e as interferências construtivas irão resultar em picos de difração fornecidos em gráficos.

Essa técnica é rápida para realização das análises e relativamente simples. O método é bastante utilizado para identificação de materiais sólidos, logo possui bastante confiabilidade no processo.

Nos difractogramas de Raios-X (DRX) foi avaliado o grau de cristalinidade da amostra, tipo de cristais, fases cristalinas bem como a investigação dos efeitos de distorção na rede cristalina devido a dopagem. A identificação da fase cristalina foi realizada comparando os picos de difração de Bragg observados nos difractogramas com os registros da JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

A difração de raio X foi medida com o equipamento XRD-6000. A técnica de difração de raios-X (DRX) foi realizada no laboratório multiusuário do Instituto de Química.

3.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é um aparelho que fornece informações sobre a morfologia do material analisado e consegue identificar os elementos químicos de uma amostra sólida. É bastante utilizado em biologia, odontologia, farmácias, engenharia, química, metalurgia, física e medicina (POLIM, 2007).

O MEV é uma das máquinas mais práticas e utilizados atualmente no meio científico, pois possui um forte poder de resolução dos materiais analisados. Um outro fator positivo em relação as características do MEV é que o mesmo fornece uma resolução tridimensional do material que está sendo observado, facilitando a coerência entre a imagem opticamente analisada e eletronicamente analisada (POLIM, 2007).

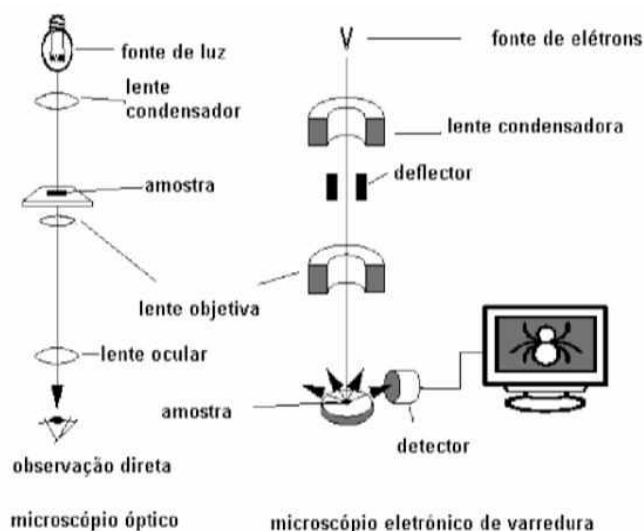


Figura 1: Comparação entre o microscópio óptico e o microscópio eletrônico de varredura (POLIM, 2007).

Como já mencionado, a microscopia eletrônica de varredura é uma técnica utilizada para investigar a morfologia e tamanho de nanocristais. Além disso, foi realizada medidas de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (acessório acoplado ao MEV), do qual é possível verificar a composição química e sua porcentagem na amostra. A técnica de microscopia eletrônica de varredura acoplada com EDS foi realizada no laboratório multiusuário da Faculdade de Engenharia Química.

3.4. Espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman consiste no espalhamento inelástico de radiação laser que incide na amostra e se dispersa em um espectrofotômetro (LARKIN, 2011).

O espalhamento ocorre quando fótons se chocam com moléculas de determinada amostra, podendo ser gasosa, líquida ou sólida. O fóton ao atingir uma molécula pode ter sua direção alterada (JR, 2018; LARKIN, 2011)

Existem dois tipos de espalhamento, o espalhamento elástico e o inelástico. No espalhamento elástico a molécula irá se comportar como uma esfera rígida, sem movimentos internos, logo o fóton espalhado irá conservar toda a sua energia inicial que possuía antes do choque com a molécula. Já o espalhamento inelástico consiste em alguns fótons, ao se chocarem com as moléculas, iniciarem um movimento dos átomos das moléculas, ou seja, o fóton excita

a molécula cedendo a ela uma parte de sua energia inicial, logo, a energia inicial do fóton é superior a energia final, pois o mesmo cedeu energia para movimentar a molécula (JR, 2018).

É uma metodologia altamente eficaz, pois consegue promover vibrações características fundamentais para determinação e análise de estruturas moleculares. A metodologia de Raman é melhor utilizada em vibrações simétricas de grupos moleculares apolares (LARKIN, 2011).

A espectroscopia Raman foi obtida em excitação de 780 nm em temperatura ambiente. A técnica de espectroscopia Raman foi realizada no laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), no Instituto de Física.

3.5. Microscopia de Força Atômica (AFM)

O AFM se baseia na varredura da superfície de determinada amostra através de uma ponta piramidal de comprimento entre 100 a 200 μm e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, acoplada a um cantilever flexível. O conjunto entre ponteira + cantilever forma a sonda, que é o componente básico do microscópio. Na parte superior do equipamento existe um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo), onde será medido as variações de posição e de intensidade (PUPIM, 2006).

A técnica de microscopia de força atômica foi realizada no laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), no Instituto de Física.

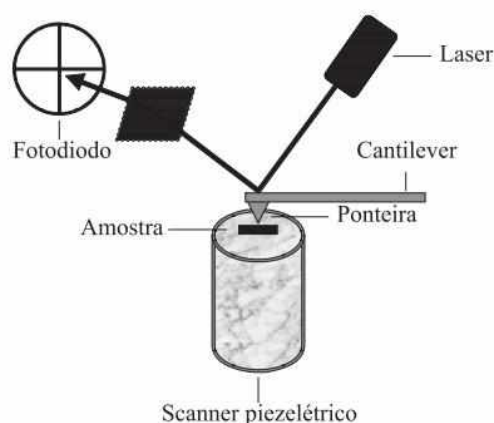


Figura 2: Explicação do equipamento de microscopia de Força Atômica (PUPIM, 2006).

3.6. Método de Solvatação

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Antes de realizar qualquer experimento biológico, foi preciso realizar o método de solvatação das nanopartículas, que consiste em atritar as nanopartículas em solução de água ultrapura, para que as nanopartículas ficassem em suspensão aquosa.

3.7. Método de Bradford

O ensaio de Bradford se baseia na ligação do corante azul aniônico Coomassie Blue G250 à proteína. A quantidade de proteína pode ser estimada em 595 nm de absorbância.

Composição do reagente de Bradford: 100 mg de Coomassie Blue G250 + 50 ml de etanol + 100 ml de ácido orto-fosfórico e completar até 100 ml de água Milli-Q. Para a metodologia de Bradford é necessária a realização de uma curva de 8 pontos com albumina bovina do soro (BSA) e água destilada.

Após a realização dos pontos da curva, foi pipetado 5 µl de cada ponto da curva e da amostra a ser analisada em diferentes poços de uma microplaca. Posteriormente foi adicionado 250 µl do reagente de Bradford em todos os poços contendo as amostras e a curva. Após essa etapa, proteger a placa da luz durante 10 minutos e realizar a leitura no espectrofotômetro a 595 nm.

3.8. Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) é usado para quantificar o malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica. A metodologia utilizada foi baseada nos estudos de YAGI, Kunio (YAGI, 1998).

Fígados de ratos do parecer de comitê de ética (número 015/17) saudáveis foram utilizados como fonte de lipídeos para realizar o experimento. O mesmo foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio com cloreto de potássio pH 7,4 e posteriormente centrifugado a 800xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante, rico em lipídeos.

Posteriormente, foram adicionados em um microtubo, 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA 10%) e 300 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67%). As amostras testadas foram as nanopartículas de TiO₂ tratadas a diferentes temperaturas (TiO₂ 500; TiO₂ 650; TiO₂ 800 °C) na concentração de 1 mg/ml e a geleia real na concentração de 0,1 g/ml. Os microtubos contendo as amostras foram vortexados e colocados em banho maria com temperatura de 100°C por 2 horas.

Após o banho maria as amostras foram mantidas em baixa temperatura por 5 minutos na câmara fria. Em seguida foram adicionados 400 μ L do solvente orgânico Butanol para melhor extração da camada de pigmento rosa, que contém o MDA.

Após a adição do butanol, cada amostra foi agitada em um vórtex durante 20 segundos e centrifugadas à 5000xg por 3 minutos, para que o butanol ficasse na parte inferior e a amostra a ser analisada ficasse na parte superior do microtubo.

Posteriormente a centrifugação, foram coletados 300 microlitros da fase superior e transferidos para uma microplaca, onde foi realizada a leitura no fluorímetro com excitação a 515nm e emissão a 553nm.

Foi realizada uma curva padrão de MDA em duplicata utilizando 1,1,3,3-tetrametroxipropano (TMP) e tampão fosfato e a mesma foi submetida as mesmas condições das amostras em questão. A hidrólise do TMP irá resultar na formação de MDA, que posteriormente será quantificada por regressão linear.

3.9. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

É um método utilizado com a finalidade de quantificar a capacidade antioxidante das amostras biológicas através do decaimento da fluorescência devido à presença de radicais peroxilas gerados através da reação com o reagente Azobis (Diidrocloreto de 2,2-azobis (2-metilpropionamidina)), resultando na oxidação da fluoresceína.

No teste utilizamos o reagente Azobis (APPH) (153 nM em tampão fosfato), como gerador de radical peroxila. A fluoresceína ($8,5 \times 10^{-5}$ nM em tampão fosfato) foi utilizada como uma sonda fluorescente e a curva padrão foi construída utilizando Trolox nas seguintes concentrações: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 μ M.

As nanopartículas de TiO_2 tratadas em diferentes temperaturas (500°C; 650°C; 800°C) foram preparadas na concentração de 0,1 mg/mL. Em cada poço da placa foi utilizado 150 μL da solução de fluoresceína, 50 μL de Trolox para a realização da curva padrão e 50 μL das amostras de TiO_2 . Para a realização do Branco, foram utilizados 150 μL da solução de fluoresceína e 25 μL de tampão fosfato. O valor obtido do Branco foi descontado do valor da leitura de todas as amostras do experimento.

Foram acrescentados 30 μL da solução Azobis (153 mM) e em seguida foi feita a leitura em espectrofluorímetro com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm a temperatura de 37°C durante 90 minutos. As leituras foram feitas a cada 1 minutos e 30 segundos durante 90 minutos.

3.10. Método do sequestro do radical DPPH (DPPH)

A metodologia do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada amostra em sequestrar o radical estável DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Essa captura é feita por um antioxidante, neutralizando o radical DPPH através de doação de átomos de hidrogênio. Quanto mais antioxidante a amostra, mais amarelo ficará a solução, porém quanto menos antioxidante a amostra, a coloração ficará com aspecto de cor violeta, que caracteriza presença do radical DPPH (ALVES e colab., 2010).

No experimento realizado, adicionou-se 225 μL do radical DPPH em cada poço em uma placa de 96 poços. O volume utilizado para as amostras (TiO_2 500°C; 650°C ;800°C) para o controle positivo (Ácido Ascórbico) e negativo (Metanol) foi de 75 μL , resultando em um volume final de 300 μL (DPPH + Amostra).

Após a adição dos reagentes, a placa foi incubada no escuro por um período de 30 minutos, e após a incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 517 nm.

3.11. Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP)

A metodologia de FRAP é comumente utilizada para identificar substâncias capazes de reduzir moléculas de Ferro, para determinar sua capacidade antioxidante. As amostras utilizadas no experimento foram as nanopartículas de TiO_2 tratadas em diferentes temperaturas (500°C; 650°C; 800°C).

A redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} foi detectada através da adição de 250 μL do reagente de FRAP (10 vol. Tampão Acetato + 1 vol. TPTZ + 1 vol. de Fe^{3+}) em 10 μL de cada amostra e adição de 25 μL de água, onde o Fe^{2+} é quelado pela 2,4,6-tri-(2 piridril)-s-triazida (TPTZ), resultando em um complexo de Fe^{2+} + TPTZ de coloração azul intensa.

Foi utilizado o reagente TROLOX para fazer a curva padrão, uma substância análoga a vitamina E, porém solúvel em água. A reação foi realizada em uma microplaca, e posteriormente incubada por 6 minutos à uma temperatura de 37°C e em seguida foi realizada a leitura à 593 nm no espectrofotômetro.

3.12. Teste de produção de Espécies Reativas em Macrófagos

Quando as nanopartículas são introduzidas intencionalmente ou não no organismo, elas podem ser reconhecidas e internalizadas por fagócitos profissionais, como por exemplo, os macrófagos (TSUGITA e colab., 2017).

O Zymosan é uma substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, composto por cadeias de polissacarídeos de diferentes pesos moleculares contendo aproximadamente 73% de polissacarídeos, 15% de proteínas, 7% de lipídeos e compostos inorgânicos (MESQUITA e colab., 2010).

O Zymosan ativa diretamente os macrófagos através de receptores Toll-Like (TLR), que por sua vez, são proteínas transmembrânicas que formam parte do sistema imunológico inato.

Após a fagocitose, os macrófagos liberam enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio, ácido araquidônico e $\text{TNF-}\alpha$. É impossível a degradação do Zymosan, logo a fagocitose do mesmo através dos macrófagos, gera uma resposta inflamatória prolongada.

O Luminol é uma substância química utilizada no experimento, o mesmo é oxidado e reage com as espécies reativas de oxigênio, emitindo assim uma luminescência para detecção de oxidação.

Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57 BL/6 foram pré-tratados com diferentes concentrações (0,1; 1 ;10 $\mu\text{g/ml}$) de nanopartículas de TiO_2 tratadas a diferentes temperaturas (500°C; 650°C; 800°C) durante 30 minutos.

O cálculo de células por poço foi de $0,1 \times 10^6$ células. Foi utilizada uma placa de 96 poços para o ensaio, onde cada poço continha um volume final de 200 μL .

Posteriormente foi adicionado o Luminol, e após essa etapa a produção de ROS foi induzida pelo Zymosan opsonizado.

A produção de ROS foi monitorada a partir da emissão de luminescência resultante da oxidação do Luminol devido a produção de espécies reativas. Após um período de 4 horas da adição do zymosan, a luminescência foi detectada em tempo real pelo leitor de microplaca EnSpire Plate Reader (Perkin Elmer®). A fim de verificar se existe alguma interação entre as NPs e o Zymosan, foi realizada a metodologia de Microscopia de Força Atômica.

3.13. Análises Estatísticas

As análises estatísticas e os histogramas foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

4.0 Resultados e Discussão

4.1 Varredura de Microscopia Eletrônica (MEV)

As figuras 3,4 e 5 abaixo mostram a imagem gerada através da microscopia eletrônica de varredura da nanopartícula de TiO_2 tratada a temperatura de 500°C .

O intuito da realização do método de Varredura de Microscopia Eletrônica foi para analisar os elementos químicos contidos nas amostras de TiO_2 em cada tratamento térmico e analisar sua estrutura morfológica

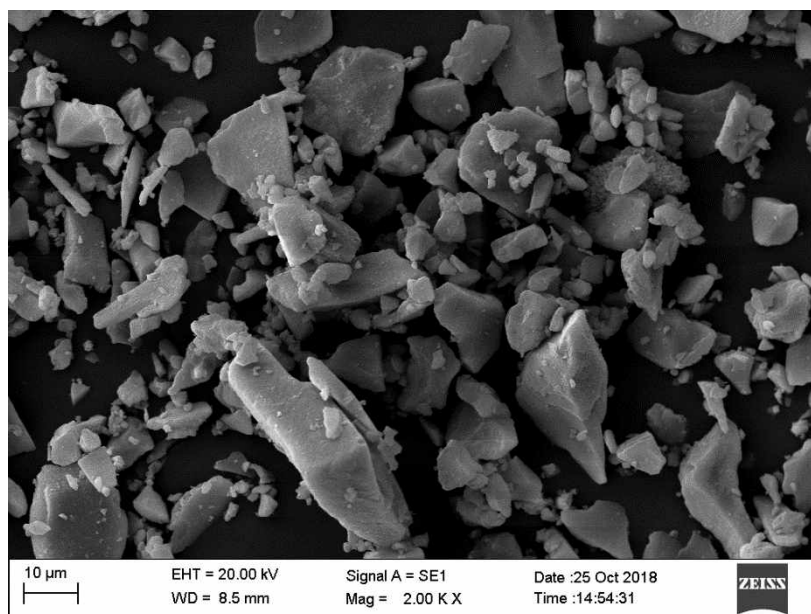


Figura 3: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 500°C analisada a 10μm.

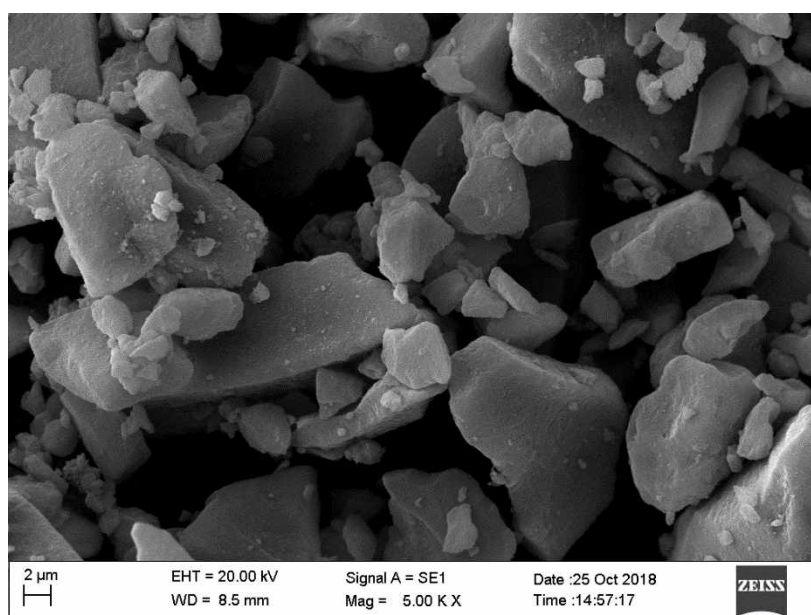


Figura 4: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 500°C analisada a 2μm.

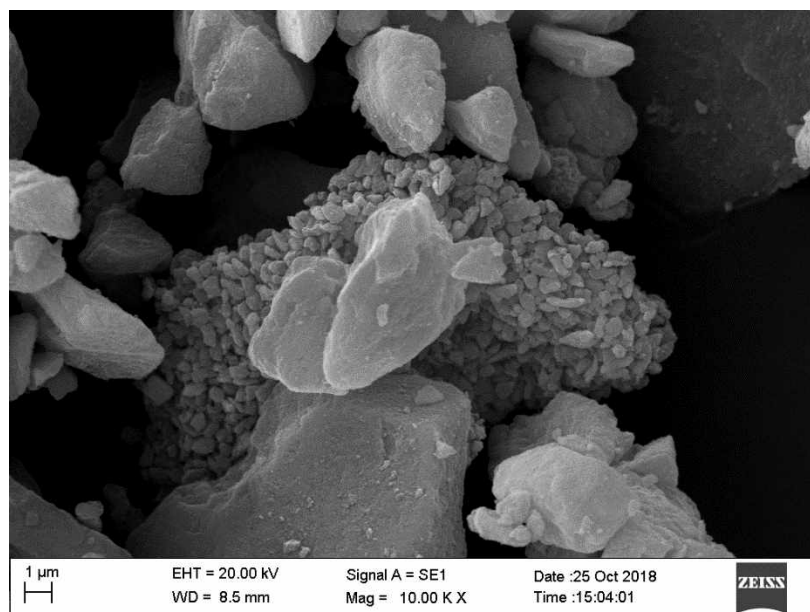


Figura 5: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 500°C analisada a $1\mu\text{m}$.

A Tabela 1 contendo os elementos químicos da amostra de TiO_2 mostrou ter os seguintes elementos: carbono (C), oxigênio (O), Sódio (Na), Titânio (Ti) e ouro (Au). Os elementos mais abundantes na amostra foram o oxigênio e o titânio, com porcentagem de 34,86% e 40,72%, provando que nas amostras analisadas e utilizadas no experimento, continha os elementos químicos corretos. O fato de ter apresentado uma alta porcentagem de ouro na análise química, no valor de 17,04%, é devido ao procedimento de preparo das amostras para serem analisadas no equipamento do MEV, pois é necessário que as amostras sejam metalizadas para que a análise seja realizada da maneira ideal.

Spectrum	In stats.	C	O	Na	Ti	Au	Total
Spectrum 1	Yes	4.05	37.41	3.38	38.53	16.64	100.00
Mean		4.17	34.86	3.20	40.72	17.04	100.00
Std. Deviation		0.17	3.60	0.25	3.11	0.57	
Max.		4.29	37.41	3.38	42.92	17.45	
Min.		4.05	32.32	3.03	38.53	16.64	

Tabela 1: Análise química molecular da amostra de TiO_2 tratada a temperatura de 500°C .

As figuras 6,7 e 8 mostram a imagem gerada através da microscopia eletrônica de varredura da nanopartícula de TiO_2 tratada a temperatura de 650°C .

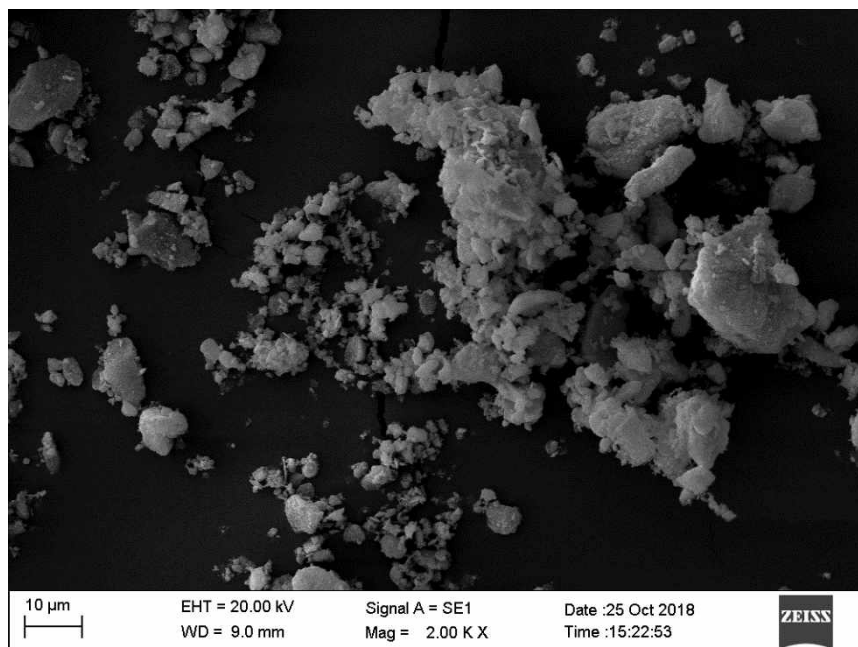


Figura 6: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 650°C analisada a $10\mu\text{m}$.

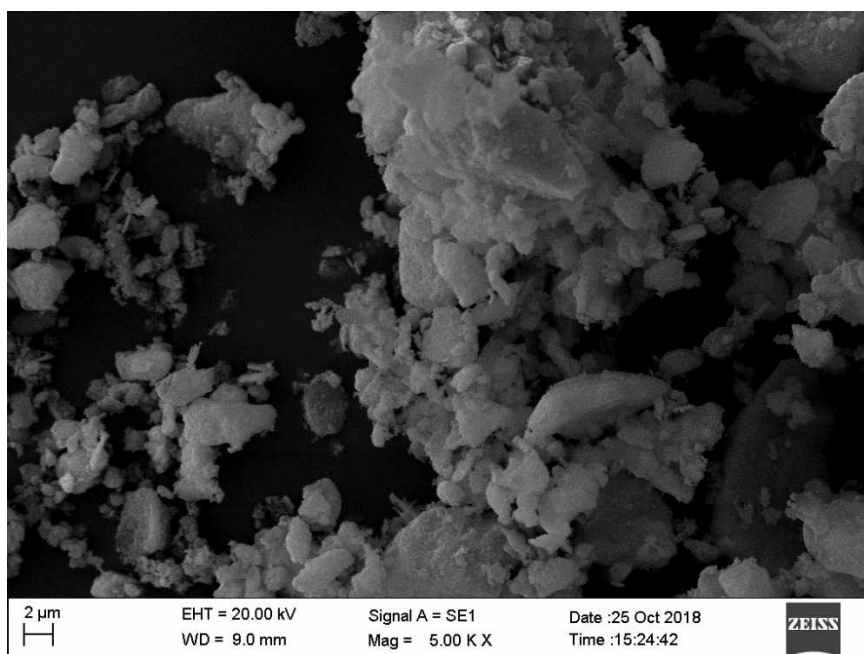


Figura 7: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 650°C analisada a $2\mu\text{m}$.

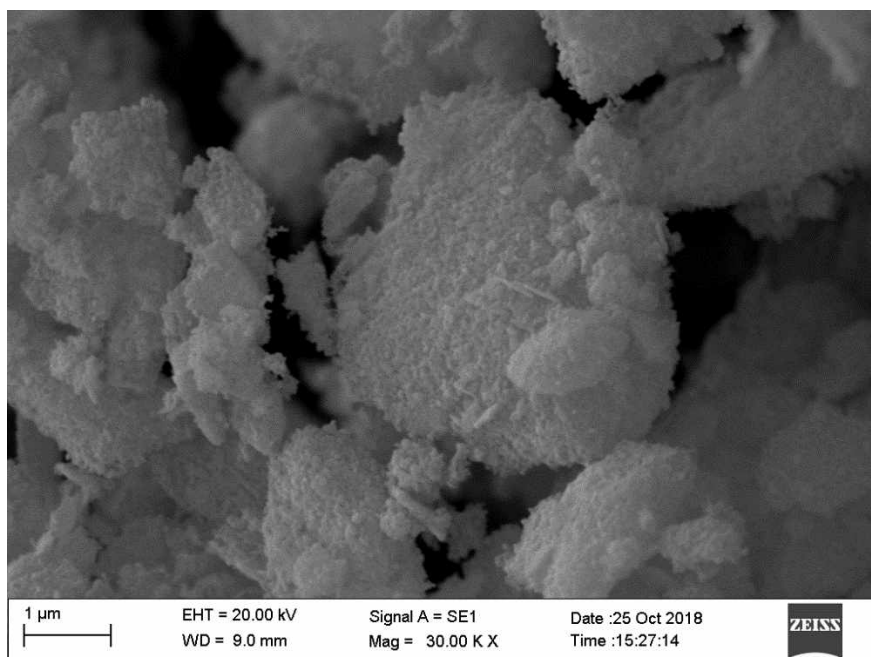


Figura 8: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 650°C analisada a $1\mu\text{m}$.

De acordo com a Tabela 2, percebemos uma alta porcentagem de moléculas de Oxigênio e Titânio, 38,45% e 28,93% respectivamente na amostra de TiO_2 650°C analisada, indicando que os elementos contidos na amostra estão corretos. A concentração de ouro na amostra foi de 16,55% pelo fato da metalização das nanopartículas no procedimento de preparo da amostra.

Spectrum	In stats.	C	O	Na	Ti	Au	Total
Spectrum 1	Yes	10.68	38.45	5.40	28.93	16.55	100.00
Mean		10.68	38.45	5.40	28.93	16.55	100.00
Std. Deviation		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Max.		10.68	38.45	5.40	28.93	16.55	
Min.		10.68	38.45	5.40	28.93	16.55	

Tabela 2: Análise química molecular da amostra de TiO_2 tratada a temperatura de 650°C .

As figuras 9,10 e 11 mostram a imagem gerada através da microscopia eletrônica de varredura da nanopartícula de TiO_2 tratada a temperatura de 800°C .

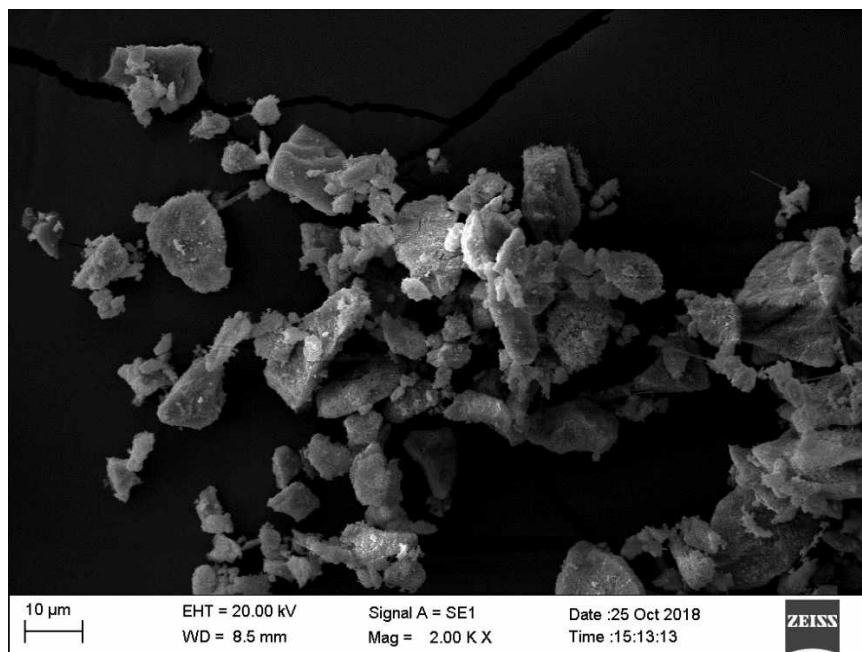


Figura 9: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 800°C analisada a $10\mu\text{m}$.

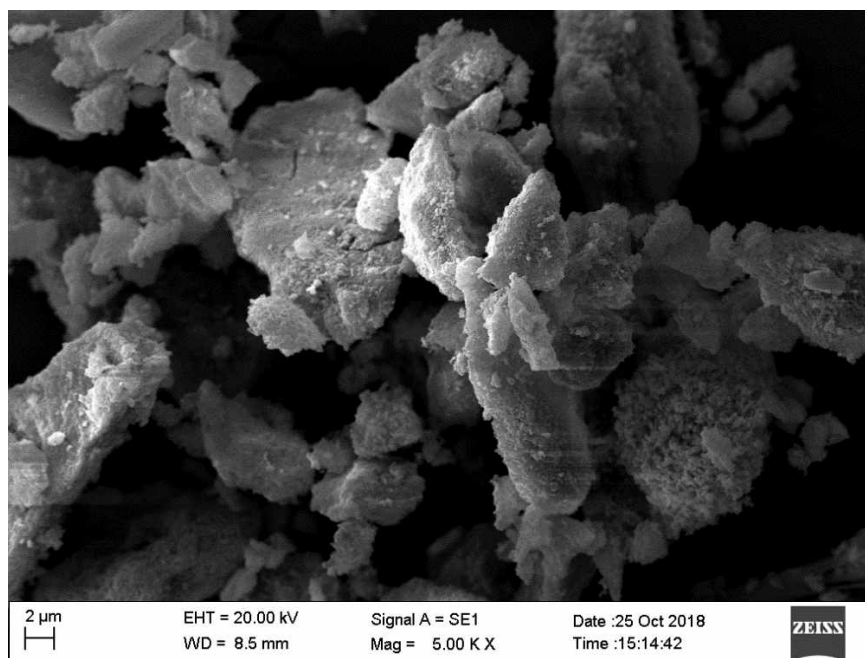


Figura 10: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 800°C analisada a $2\mu\text{m}$.

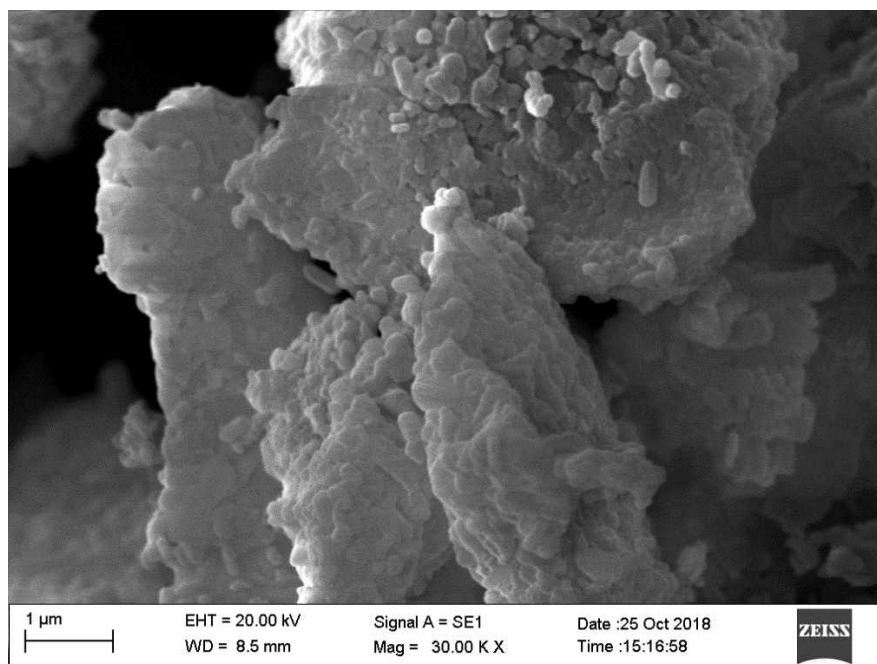


Figura 11: Microscopia eletrônica de Varredura da amostra de TiO_2 tratada a 800°C analisada a $1\mu\text{m}$.

De acordo com a Tabela 3, percebemos altas porcentagens de moléculas de Oxigênio e de Titânio, 38,44% e 34,54% respectivamente na amostra de TiO_2 800°C , comprovando novamente que a nanopartícula utilizada no experimento continha os elementos corretamente descritos. A porcentagem de ouro foi quantificada em 14,96% devido a etapa de metalização das amostras no processo experimental.

Spectrum	In stats.	C	O	Na	Ti	Au	Total
Spectrum 1	Yes	6.80	38.44	5.27	34.54	14.96	100.00
Mean		6.80	38.44	5.27	34.54	14.96	100.00
Std. Deviation		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Max.		6.80	38.44	5.27	34.54	14.96	
Min.		6.80	38.44	5.27	34.54	14.96	

Tabela 3: Análise química molecular da amostra de TiO_2 tratada a temperatura de 800°C .

4.2 Difração de Raio X

A Figura 12 apresenta os padrões de difração de raios X das amostras submetidas a recozimento térmico a 500°C/1h, 650°C/1h e 800°C/1h e a Tabela 4 representa a porcentagem e o tamanho das NPs na forma anatase, brokita e rutila. Os padrões característicos das difrações do dióxido de titânio em Anatase, Rutila e Brokita estão representados pelos símbolos (*), (**) e (***), respectivamente.

O aumento elevado da temperatura de recozimento até 500°C é crucial para transformação da fase anatase para rutila e no crescimento dos nanocristais (Tabela X). Nas amostras tratadas a 650°C/1h, a transformação da fase anatase para rutila é mais perceptível. Com o aumento da temperatura térmica para 800°C/1h, observou-se maior formação da fase brokita dos nanocristais, apresentando 16% de peso de brokita.

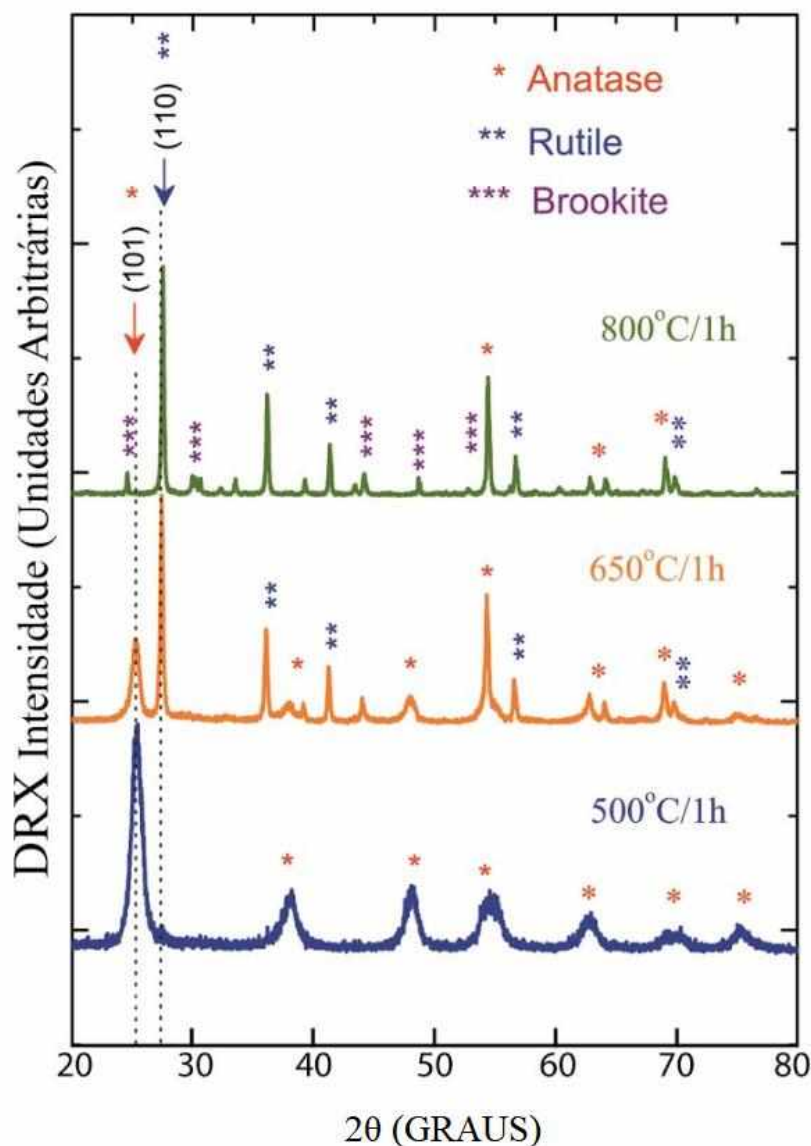


Figura 12: Padrões de Difração de Raio X das amostras submetidas a recozimento termal.

Recozimento Termal	Tamanho (nm)	Anatase (%)	Rutila (%)	Brokita (%)
500°C/ 1h	8.5	91,06	8,94	0
650°C/ 1h	32	35,44	64,56	0
800°C/ 1h	44.1	0,00	84,07	15,93

Tabela 4: Tamanho e porcentagem das nanopartículas de TiO₂ em anatase, rutila e brokita, submetidos a recozimento termal.

As três fases da nanopartícula de TiO₂ (anatase, brokita e rutila) possuem uma semelhança em sua estrutura, todas são revestidas pelo titânio e internamente o O₂ se aglomera (LANDMANN e colab., 2012).

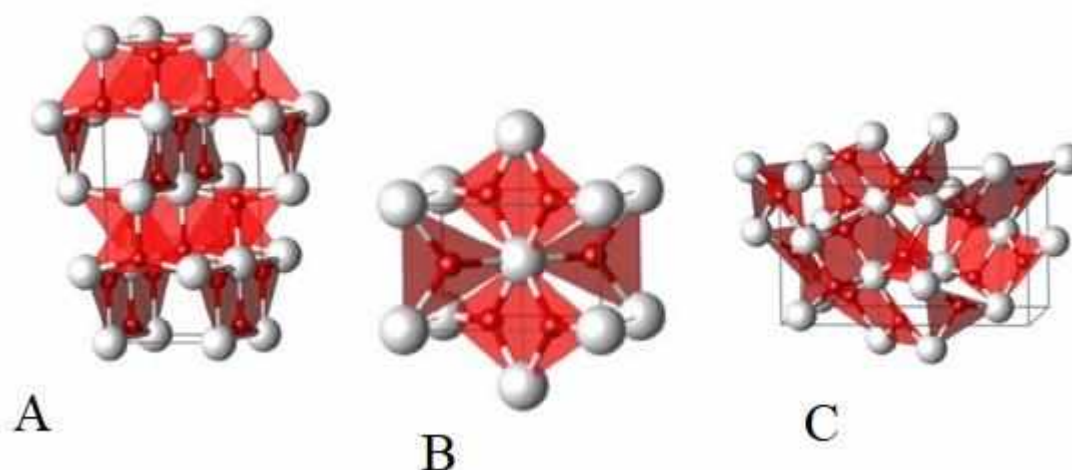


Figura 13: Característica estrutural das nanopartículas de TiO₂ na forma anatase (A), rutila (B) e brokita (C). O Titânio é representado pelas esferas brancas e o Oxigênio pelas esferas vermelhas (LANDMANN e colab., 2012).

4.3 Espectroscopia Raman

A Figura 14 mostra os espectros micro-Raman dos nanocristais de TiO₂ submetidos ao recozimento térmico. Todos os espectros foram normalizados para o pico de maior intensidade, para facilitar a visualização dos modos ativos micro-Raman.

Nos espectros micro-Raman de amostras emparelhadas a 500°C/1h, há os modos vibracionais da fase anatase. Com o aumento da temperatura térmica de recozimento para

650°C/1h ocorreu a transformação da fase anatase em fase rutila e algumas alterações no espectro Raman dos nanocristais de TiO₂. Essas alterações estão relacionadas à formação da fase broquita, fato que concorda com a análise de Difração de Raio X (Imagem X).

Nos espectros relacionados a 800°C/1h, existem modos de vibração da fase de broquita, e esse resultado confirma a presença da mesma, uma vez que a presença dessa fase não foi muito bem apresentada nos padrões de Difração de Raio X.

Portanto, baseado nos resultados de Difração de Raio X e Espectroscopia Raman, podemos concluir que os nanocristais de dióxido de titânio possuíam alta pureza e apresentaram diferentes fases em função do tratamento de recozimento térmico.

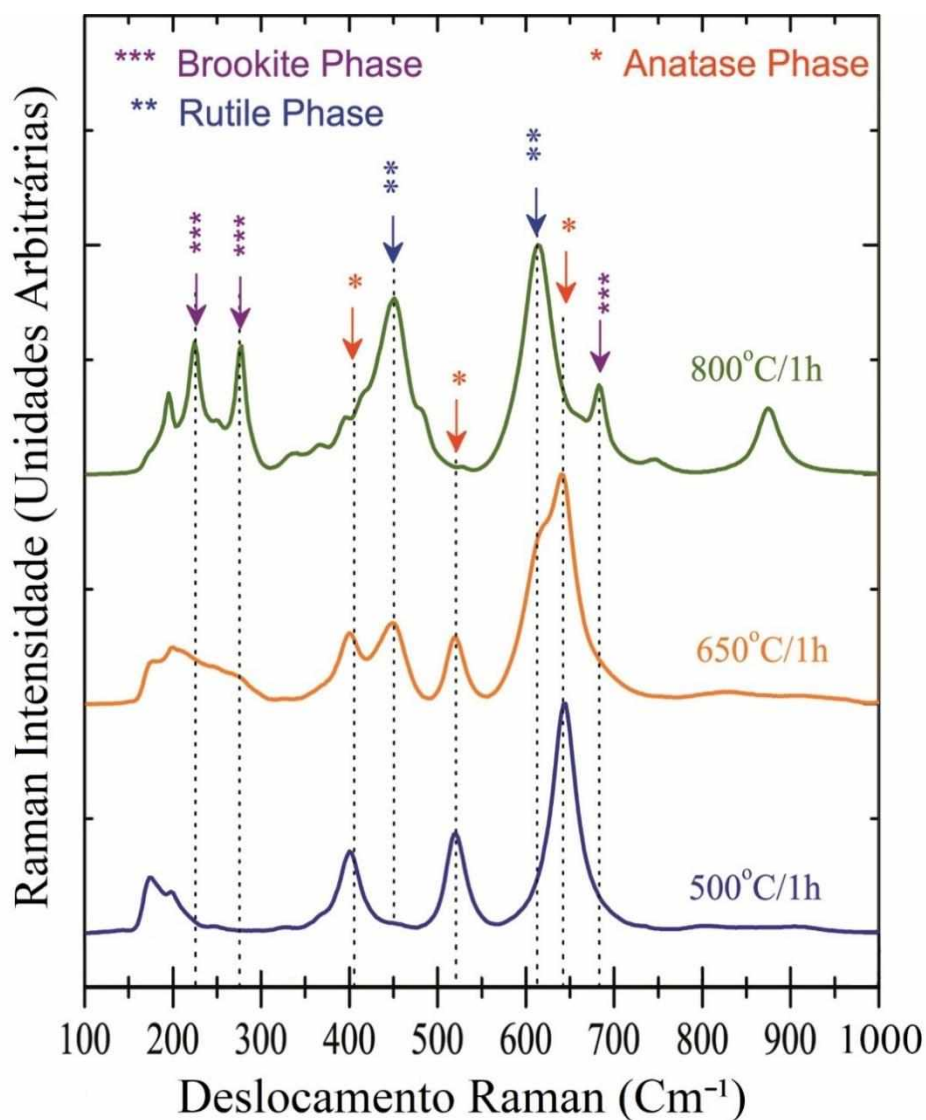


Figura 14: Espectroscopia Raman das nanopartículas de TiO₂ submetidos ao recozimento térmico.

4.4. Método de Bradford

Foi realizado a metodologia de Bradford com finalidade de identificar a quantidade de proteínas que continha em 0,1 g/ml da amostra de Geleia Real. A quantidade de proteínas medida foi de 3,58 mg/ μ l.

4.5. Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP)

Os histogramas apresentam os resultados obtidos da capacidade antioxidante total das nanopartículas de TiO_2 em relação a sua capacidade de redução de ferro.

Como controle positivo (CT+) em todos os gráficos do FRAP foi utilizado o ácido ascórbico, pois novamente se mostrou ser um ótimo quelante de ferro (IRIS F. F. BENZIE, 1996), promovendo uma capacidade antioxidante considerável.

Analisando os resultados nos histogramas, notamos que os nanocristais de TiO_2 vão ganhando certo potencial antioxidante com o aumento da concentração, porém são valores não muito altos comparados com a geleia real e o controle positivo.

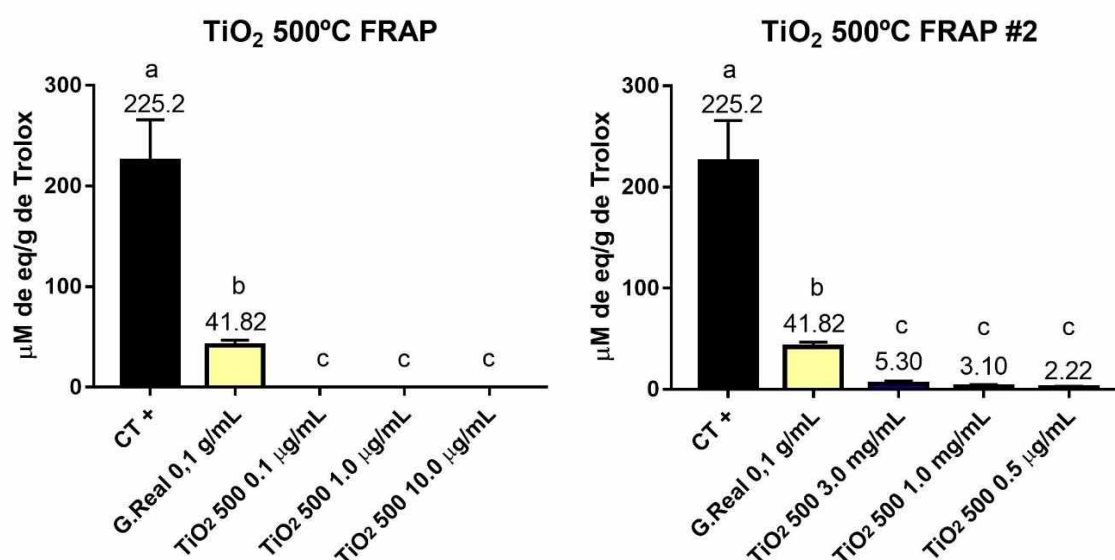


Figura 15 e 16: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe^{3+} para Fe^{2+} . Juntamente no experimento foi testada a capacidade antioxidante da Geleia Real. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

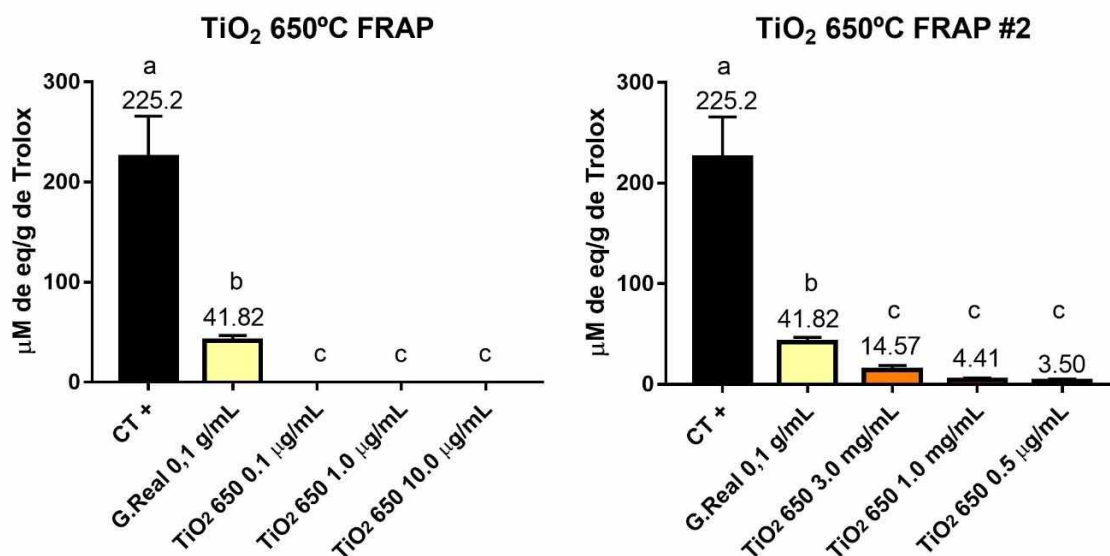


Figura 17 e 18: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 650°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe³⁺ para Fe²⁺. Juntamente no experimento foi testada a capacidade antioxidante da Geleia Real. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

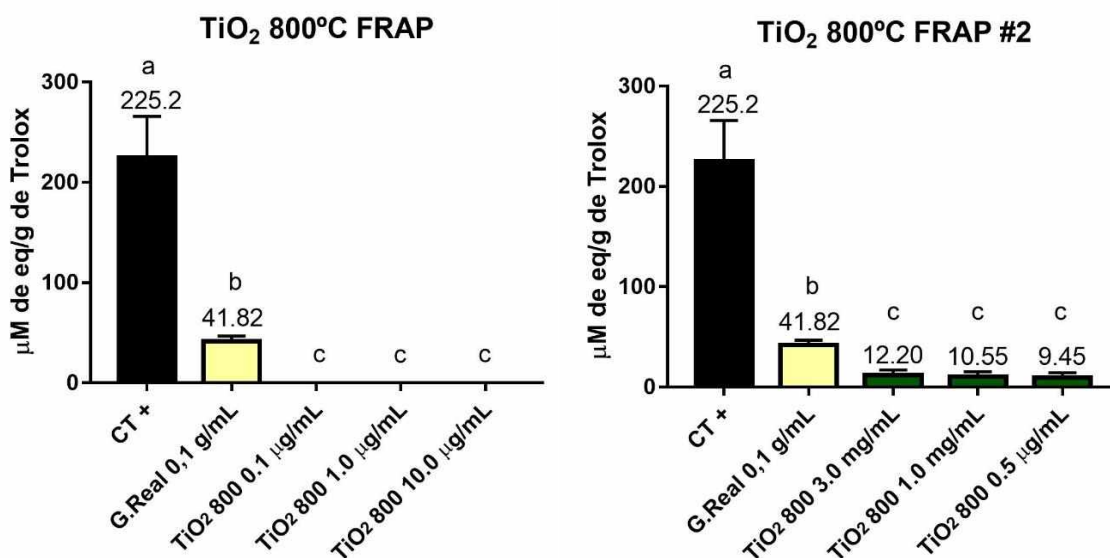


Figura 19 e 20: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 800°C em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe³⁺ para Fe²⁺. Juntamente no experimento foi testada a capacidade antioxidante da Geleia Real. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram

diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

Os histogramas 21,22 e 23 abaixo apresentam os resultados obtidos ao se misturar as nanopartículas com a geleia real, onde as nanopartículas atrapalharam o efeito da geleia real em relação a sua atividade antioxidante, possivelmente pelo fato do titânio envolto a molécula de TiO_2 ter certa afinidade pelo carboidrato da composição geleia, fazendo assim uma possível ligação com a geleia real, “ocupando” grande parte da geleia na solução e de suas características antioxidantes, e consequentemente dificultando seu efeito redutor do ferro (GURZAWSKA e colab., 2012). O controle positivo (CT+) utilizado novamente foi o ácido ascórbico.

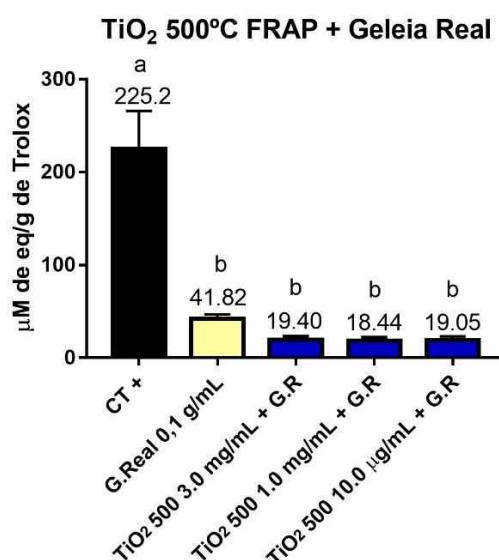


Figura 21: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe^{3+} para Fe^{2+} . As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

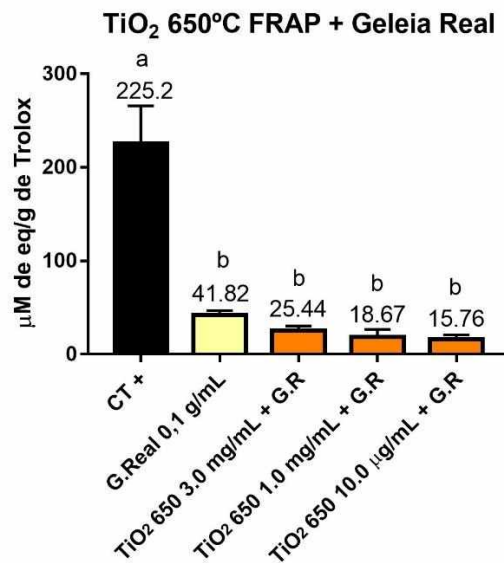


Figura 22: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 650°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe³⁺ para Fe²⁺. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

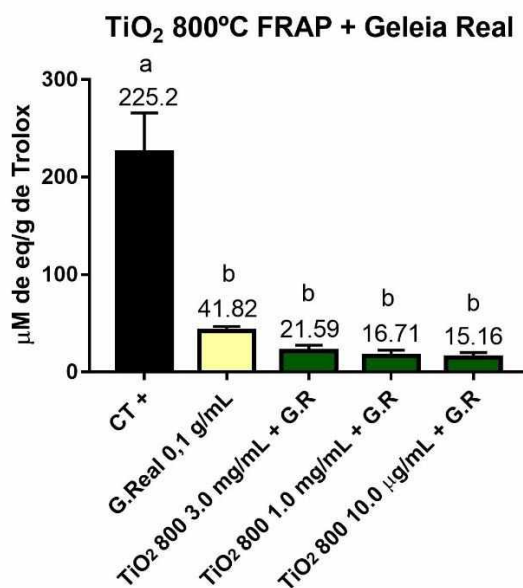


Figura 23: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 800°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de redução de moléculas de Fe³⁺ para Fe²⁺. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

A afinidade com a água e a estabilidade de dispersão das nanopartículas é um dos principais fatores que devem ser levados em consideração antes de usá-las em qualquer meio. A estabilidade de dispersão pode ser influenciada por vários parâmetros, como: as características intrínsecas das nanopartículas, a solução onde ela está dispersa e a absorção intencional ou não de diferentes macromoléculas na superfície da nanopartícula (BRUNETTE e colab., 2001; LABILLE e BRANT, 2010).

Muitos óxido-metais sofrem hidrólise na presença da água e formam camadas de hidróxidos em sua superfície. A formação de uma hidroxila polar na superfície do óxido-metal faz com que a mesma atraia e absorva outras camadas de moléculas de água polares, que consequentemente irá conferir uma característica hidrofílica no óxido-metal (COSTA e colab., 2006; LABILLE e BRANT, 2010).

A estrutura das nanopartículas de TiO_2 consiste em átomos de oxigênio triplamente coordenados para um átomo de titânio. A superfície do TiO_2 pode ter grupos de oxigênio isolados, duplos ou triplamente coordenados, onde a proporção destes grupos depende da estrutura da nanopartícula e sua síntese. A carga que falta nos grupos isolados e duplos de oxigênio pode ser compensada pela ligação iônica de um ou dois prótons da solução aquosa em que a nanopartícula está, esse fato irá estabilizar os elétrons da nanopartícula, deixando a nanopartícula estável (LABILLE e BRANT, 2010).

As nanopartículas de TiO_2 estão estáveis em solução aquosa, não estando eletronicamente ativas para doarem elétrons ao ferro para reduzi-lo, consequentemente não foi detectada nenhuma atividade antioxidante do TiO_2 e o motivo das nanopartículas irem ganhando certa atividade antioxidante com o aumento da concentração, se deve pelo fato de que quanto maior a quantidade de nanopartículas em um mesmo volume constante de água, menos moléculas de H_2O estarão disponíveis para estabilizar essas NPs, fazendo assim com que elas não fiquem totalmente estáveis em altas concentrações (DIEBOLD, 2002)

4.6. Método do sequestro do radical DPPH (DPPH)

Os histogramas abaixo apresentam os dados obtidos através do teste de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) pelos nanocristais de dióxido de titânio tratados em diferentes temperaturas.

Estudos comprovam que o ácido ascórbico é uma molécula eficaz e importante no método de sequestro do radical DPPH, pois é um antioxidante rápido e eficiente, muito utilizado como controle positivo para comparação entre amostras (OM P. SHARMA, 2008).

Analisando os gráficos percebemos que os nanocristais de TiO_2 não conseguiram sequestrar o radical DPPH, mostrando que não possuem função antioxidante em comparação com o ácido ascórbico. As menores concentrações de todas as nanopartículas de TiO_2 obtiveram baixas porcentagens de sequestro de DPPH, e as concentrações de 3.0 mg/mL e 10.0 $\mu\text{g/mL}$ da nanopartícula tratada a 800°C obtiveram os maiores resultados em porcentagem.

O controle positivo (CT+) utilizado foi o ácido ascórbico e o controle negativo (CT-) foi o metanol, juntamente no experimento foi testada a capacidade antioxidante da Geleia Real.

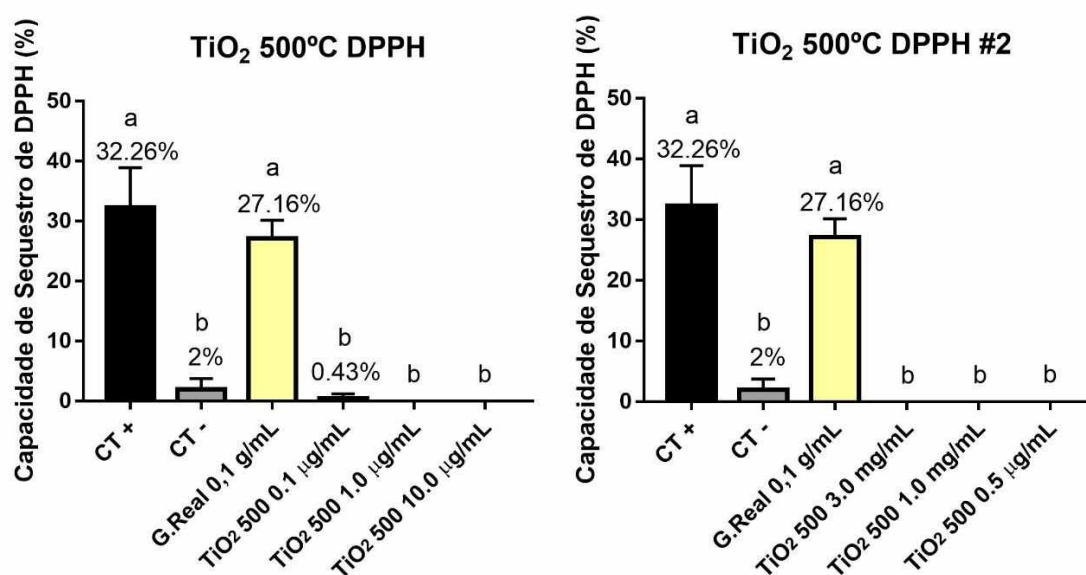


Figura 24 e 25: Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO_2 tratada a 500°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

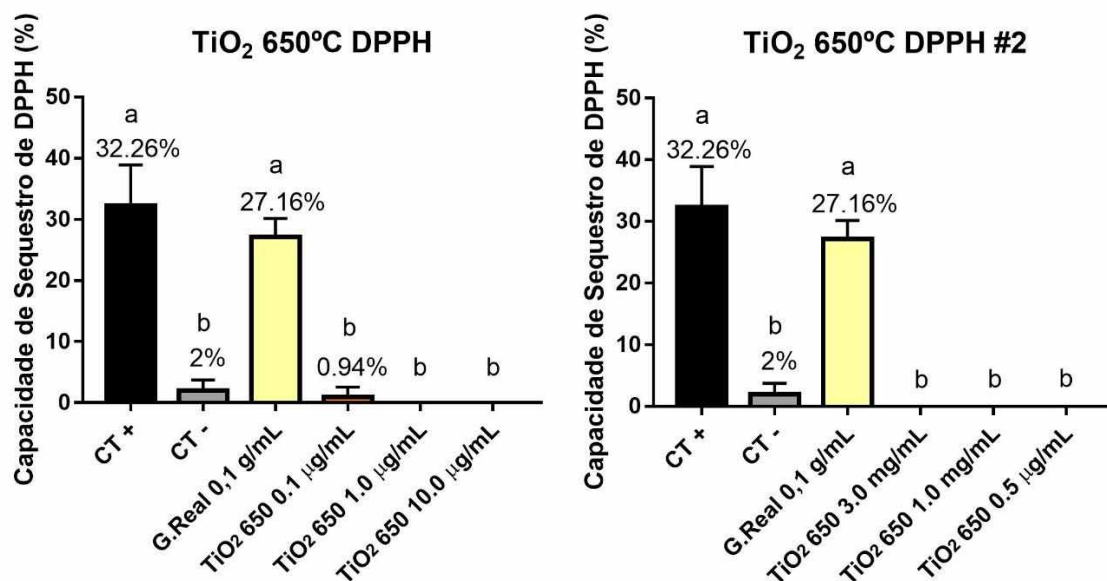


Figura 26 e 27: Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 650°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

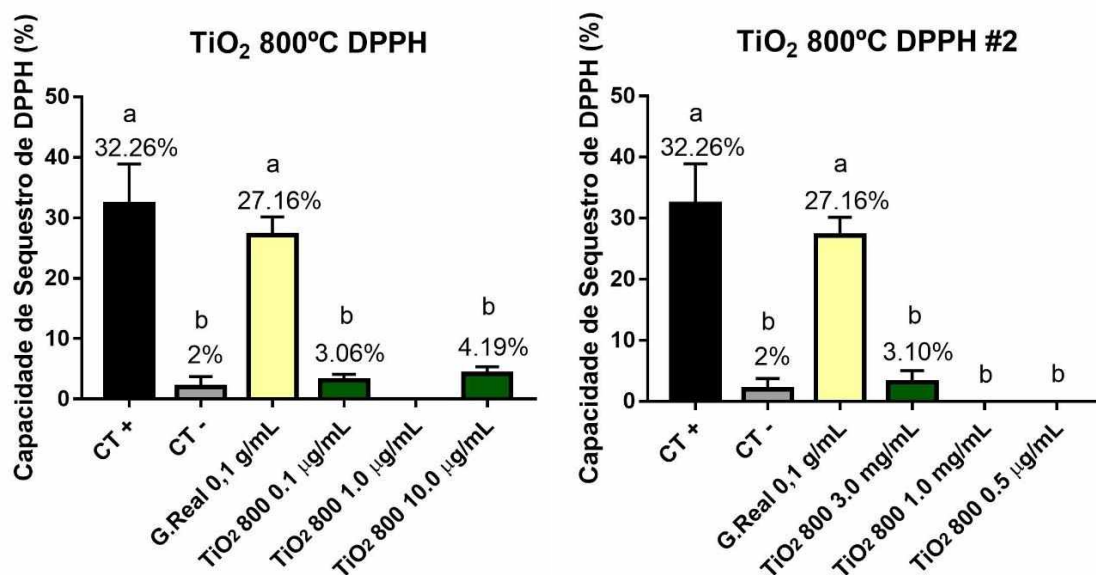


Figura 28 e 29: Histogramas comparativos entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 800°C em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

O radical DPPH é considerado uma molécula estável, e a metodologia consiste no sequestro de DPPH para reduzi-lo a hidrazina através de um doador de hidrogênio. As nanopartículas de TiO₂ não possuem a capacidade de doar hidrogênio para ocorrer essa redução do DPPH, contudo as NPs não apresentaram características antioxidantes isoladamente (ALVES e colab., 2010).

As figuras 30, 31 e 32 abaixo apresentam o poder efetivo da geleia real isolada em relação ao radical DPPH, porém ao associar as nanopartículas de TiO₂ a geleia, o efeito antioxidante da geleia real foi reduzido, mostrando que as nanopartículas não tiveram efeito potencializador, mas pelo contrário, as NPs atrapalharam o efeito antioxidante da geleia real, dificultando sua atividade sobre o radical DPPH. Como controle positivo (CT+) foi utilizado novamente o ácido ascórbico e o controle negativo foi utilizado o metanol (CT-).

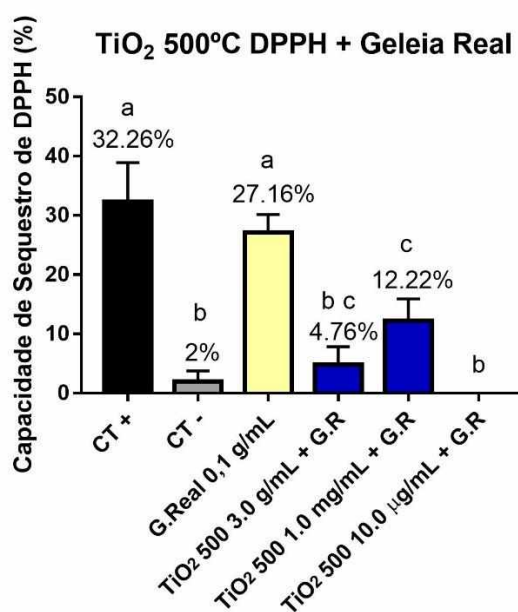


Figura 30: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 500°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

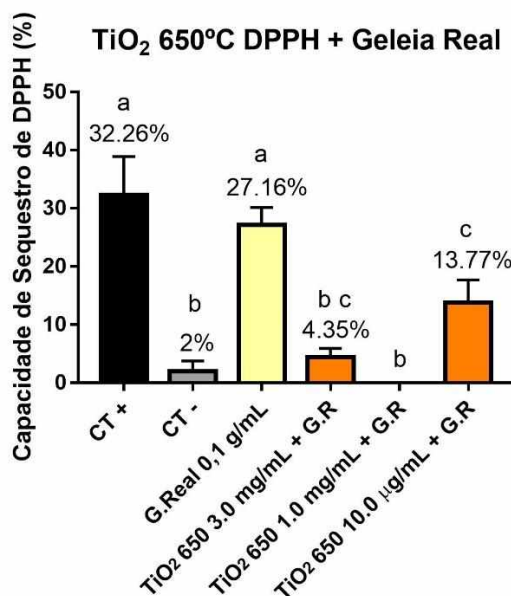


Figura 31: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 650°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

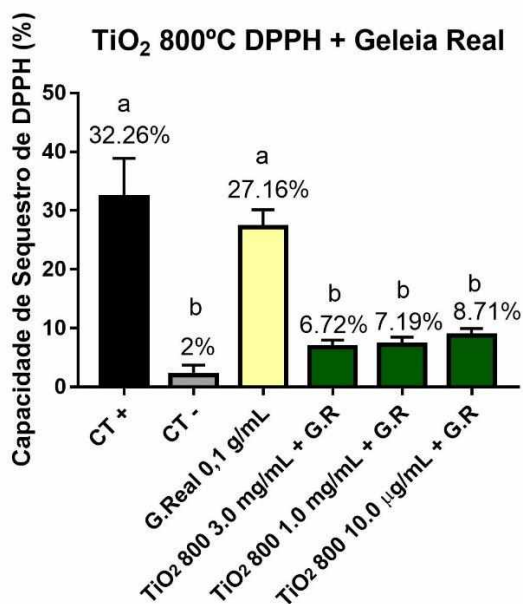


Figura 32: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 800°C associada a geleia real em relação a sua capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

Em alguns trabalhos as NPs de TiO_2 são descritas com características antioxidantes e com alta biocompatibilidade, indicando uma ótima solução para carreamento de fármacos (MAURICIO e colab., 2018). Porém em outros artigos foram relatados que o TiO_2 possui característica citotóxica e oxidante. Tais características oxidantes ou antioxidantes das NPs são dependentes do tamanho, superfície e seus respectivos método de síntese (ANDREOLI e colab., 2018; SUN e colab., 2017).

As nanopartículas de TiO_2 testadas não conseguiram sequestrar o radical DPPH e também não conseguiram potencializar o efeito da geleia real, possivelmente pelo fato das NPs serem óxido-metálicas e estáveis em solução aquosa, não conseguindo doar hidrogênio ao radical DPPH (ALVES e colab., 2010). O Titânio não consegue interagir com o radical livre DPPH, muito pelo contrário, o TiO_2 diminuiu o efeito antioxidante da geleia real, possivelmente devido à ligação que o titânio das NPs faz com as moléculas orgânicas da geleia, fazendo assim com que o nanocristal de TiO_2 não atue como um agente antioxidante, independentemente de seu tamanho ou fase cristalina, mas sim atue como um composto que dificulta a ação antioxidante da geleia real (BRUNETTE e colab., 2001; DIEBOLD, 2002).

4.7. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

Os histogramas abaixo apresentam o efeito antioxidante da geleia real já descrito na literatura (PAVEL e colab., 2011) e também mostram um valor extremamente alto e curioso das nanopartículas de TiO_2 .

A metodologia do ORAC se baseia na capacidade antioxidante da amostra medida pela habilidade de proteger a fluoresceína da oxidação causada pelo reagente azobis. (ANDRÉ e SILVA, 2010)

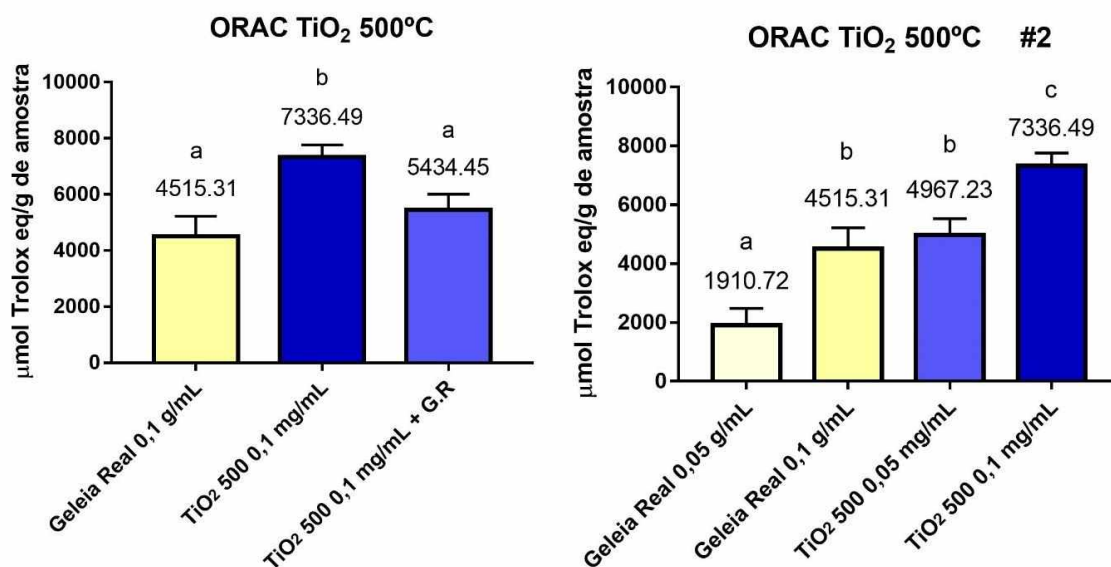


Figura 33 e 34: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 500°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

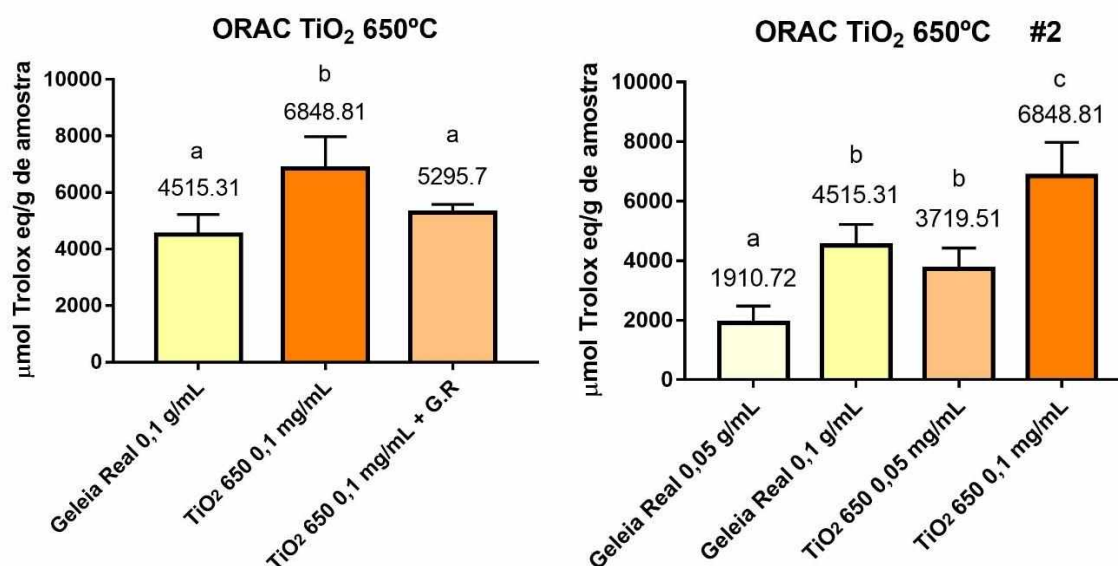


Figura 35 e 36: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 650°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

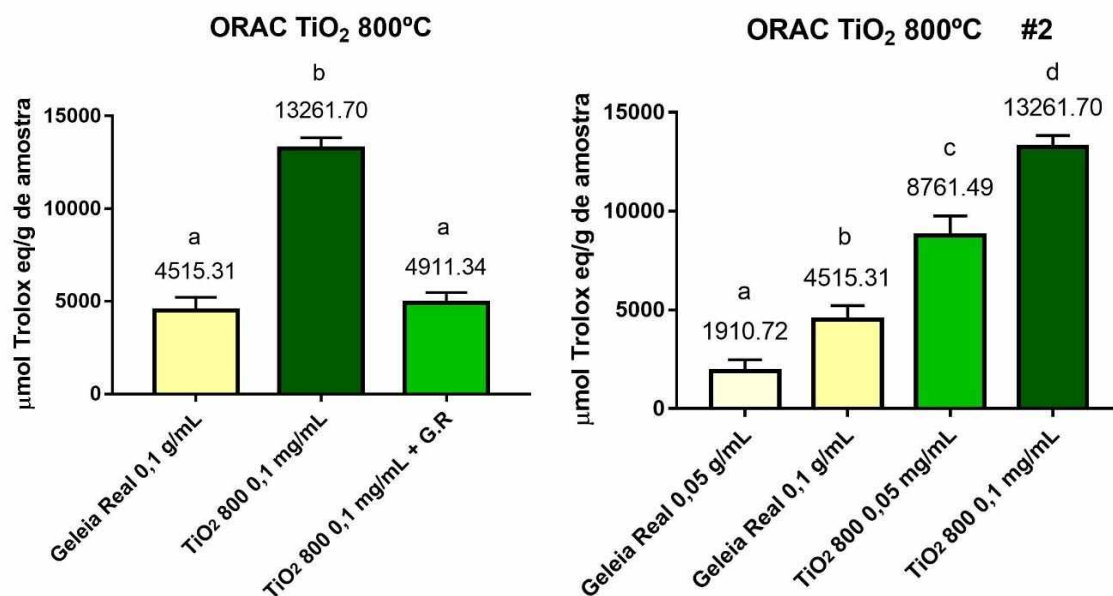


Figura 37 e 38: Histograma comparativo entre as diferentes concentrações de TiO₂ tratada a 800°C isolada e associada a geleia real, em relação a sua capacidade de sequestro do radical peroxil. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

A fluoresceína é um corante xantênico de fórmula molecular C₂₀H₁₂O₅ que possui emissão de fluorescência intensa. É bastante utilizada na medicina para determinação de circulação sanguínea. Estudos comprovam que o TiO₂ consegue se ligar na fluoresceína através de ligações polares, assim como consegue se ligar em carboidratos [C_x(H₂O)_y]. (INOC e colab., 2000).

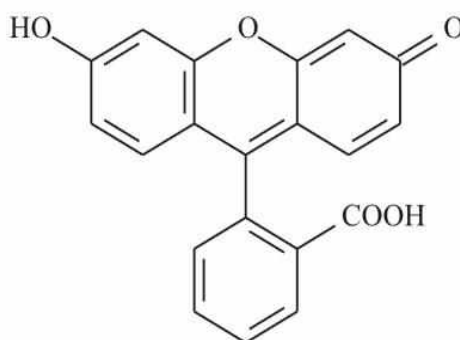


Figura 39: Estrutura molecular da fluoresceína (ALVES e colab., 2010).

A ligação polar entre o TiO_2 e a fluoresceína faz com que o reagente azobis tenha dificuldade em reagir e degradar a fluoresceína, logo os histogramas apresentaram um valor falso positivo das nanopartículas de TiO_2 , pois elas interagem fortemente com a fluoresceína e não com o reagente azobis, onde a nanopartícula que prevalece na forma anatase (500°C) interage mais que a nanopartícula que prevalece na forma rutila (650°C) e a nanopartícula que possui características da forma brookita em sua fórmula (800°C) conseguiu interagir ainda mais com a fluoresceína, apresentando valores muito altos nos resultados, não sendo possível estimar os valores antioxidantes das nanopartículas pela metodologia do sequestro do radical peroxil (ALVES e colab., 2010; INOC e colab., 2000).

4.8. Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados obtidos no experimento do TBARS estão representados nos histogramas abaixo. A concentração utilizada de todas as nanopartículas foi de 1 mg/ml e da geleia real foi de 0,1 g/ml.

Na Figura 40 notou-se o efeito antioxidante da geleia real e do ácido ascórbico em relação ao homogeneizado isolado, e o efeito oxidante do ferro e do ascorbil (ferro + ácido ascórbico).

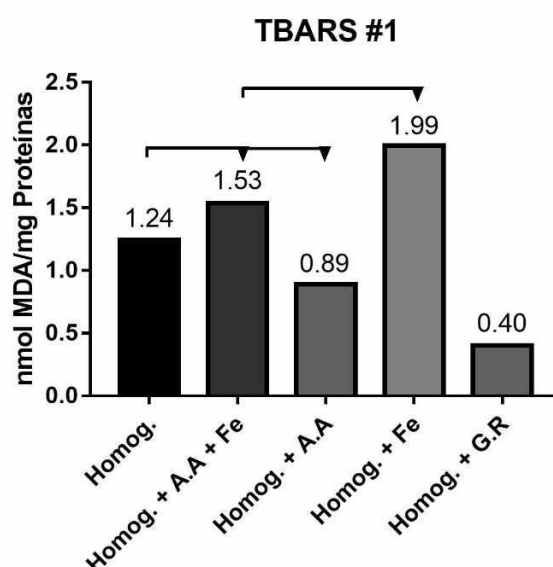


Figura 40: Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. A reta acima das barras indica as amostras que não obtiveram significância estatística entre si, começando a leitura pela curva da reta e terminando na seta indicativa.

Na Figura 41 notou-se o leve efeito antioxidante das nanopartículas de TiO_2 , que se perde com o aumento do tamanho das nanopartículas, onde a nanopartícula tratada a 500°C obteve um efeito antioxidante melhor do que a nanopartícula tratada a 800°C que possui maior tamanho.

Devido a forma molecular dos lipídeos de membrana ser basicamente constituída de carbono, hidrogênio e oxigênio, o titânio revestido nas nanopartículas consegue possivelmente promover uma interação com os lipídeos, assim como essas NPs interagem com a geleia real, se ligando aos lipídeos de membrana, atuando como uma barreira, dificultando a peroxidação lipídica (DECUZZI e MITRAGOTRI, 2016; GURZAWSKA e colab., 2012; RAMANA e colab., 2017).

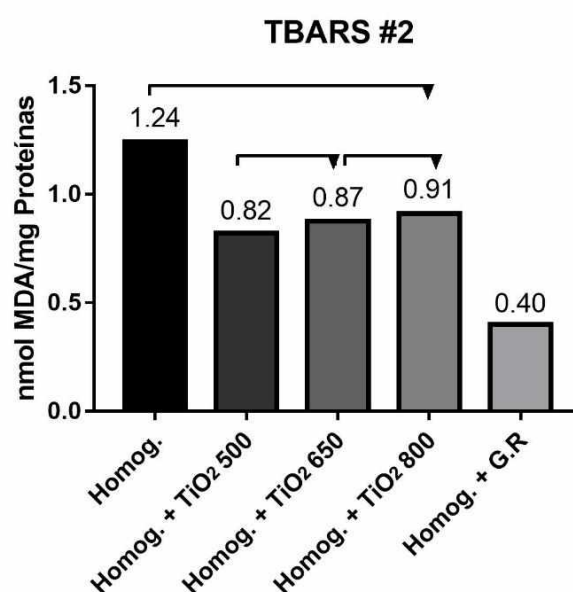


Figura 41: Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. A reta acima das barras indica as amostras que não obtiveram significância estatística entre si, começando a leitura pela curva da reta e terminando na seta indicativa.

Na Figura 42 observou-se o efeito oxidante do ascorbil no homogeneizado, onde esse efeito é levemente inibido pelas nanopartículas de TiO_2 . Os efeitos antioxidantes decaem com o aumento da nanopartícula e a geleia real foi a amostra que obteve maior efeito antioxidante contra o ascorbil.

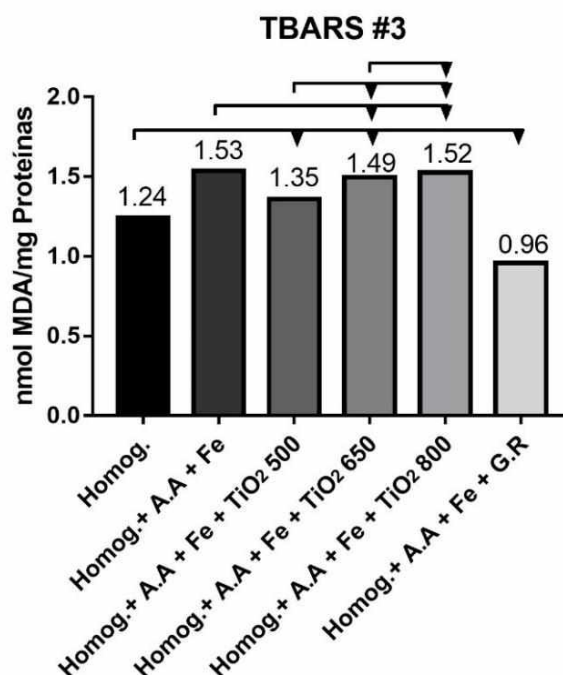


Figura 42: Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. A reta acima das barras indica as amostras que não obtiveram significância estatística entre si, começando a leitura pela curva da reta e terminando na seta indicativa.

Na Figura 43 observou-se o efeito antioxidante do ácido ascórbico isolado, e a pequena perda do efeito antioxidante do mesmo quando junto com as NPs. Esse efeito reduzido das nanopartículas juntamente com o ácido ascórbico se deve pelo fato do titânio das NPs possivelmente se ligar ao ácido ascórbico de fórmula molecular $C_6H_8O_6$, formando um complexo de titânio + ácido ascórbico inibindo o efeito antioxidante do ácido ascórbico assim como inibe o efeito antioxidante da geleia real, uma vez que já foi descrito na literatura que as nanopartículas se ligam em algumas moléculas orgânicas (GURZAWSKA e colab., 2012).

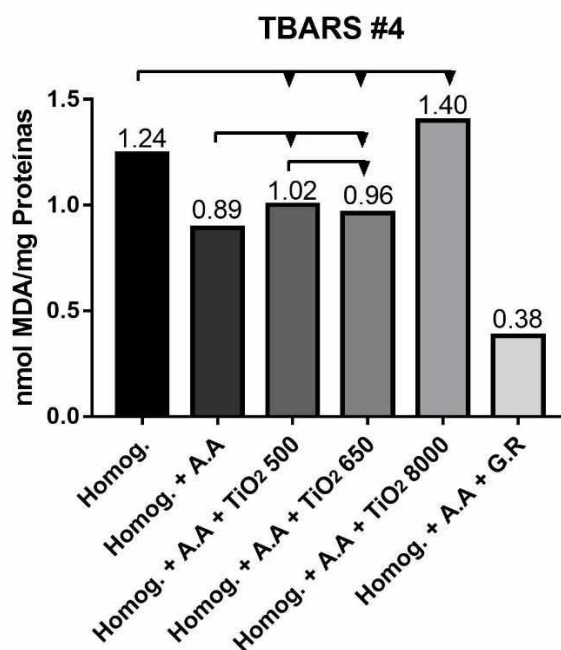


Figura 43: Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. A reta acima das barras indica as amostras que não obtiveram significância estatística entre si, começando a leitura pela curva da reta e terminando na seta indicativa.

Na Figura 44 notou-se o efeito oxidante do ferro no homogeneizado e o efeito antioxidante das nanopartículas quando juntas com o ferro, inibindo levemente o efeito destrutivo do ferro no homogeneizado.

Novamente as nanopartículas se mostraram eficientes para inibição da peroxidação contra o ferro, uma vez que as nanopartículas estando estáveis em solução aquosa não conseguem interagir com o ferro, contudo o titânio das NPs continuam a interagir com os lipídeos de membrana, atuando como uma barreira e dificultando a peroxidação lipídica novamente (MOSTÉFA-SBA e colab., 1999).

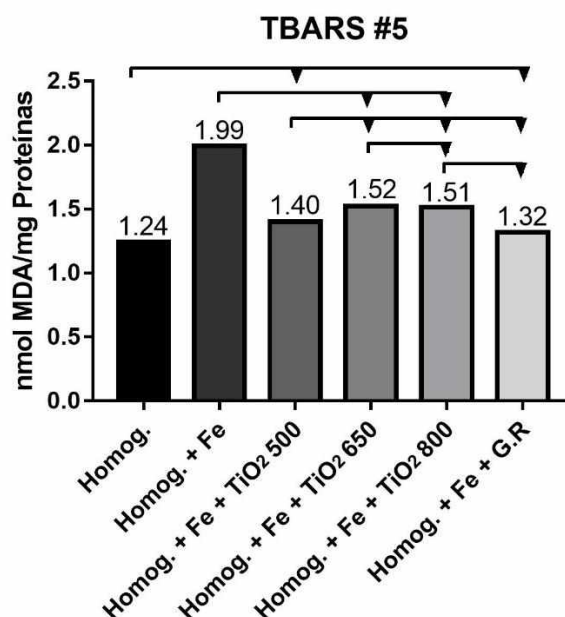


Figura 44: Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. A reta acima das barras indica as amostras que não obtiveram significância estatística entre si, começando a leitura pela curva da reta e terminando na seta indicativa.

Na Figura 45 observou-se a redução do efeito antioxidante da geleia real quando a mesma está junta com as nanopartículas.

Essa redução do efeito antioxidante da geleia real se deve possivelmente pelo fato das nanopartículas interagirem fortemente com as moléculas orgânicas da geleia, ocultando sua característica antioxidante, consequentemente, não protegendo o homogeneizado da peroxidação lipídica (ALVES e colab., 2010; GURZAWSKA e colab., 2012).

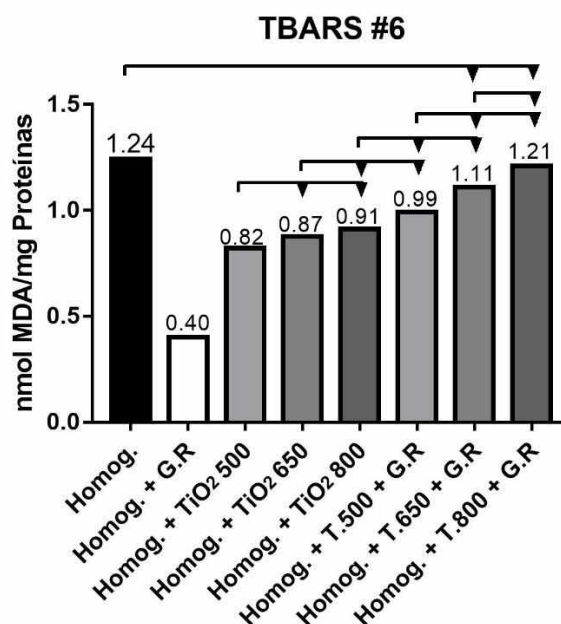


Figura 45: Histograma comparativo das amostras no método das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. A reta acima das barras indica as amostras que não obtiveram significância estatística entre si, começando a leitura pela curva da reta e terminando na seta indicativa.

Nos histogramas comparativos pode-se observar que novamente o titânio que reveste as nanopartículas mostrou se ligar em moléculas orgânicas, no caso se ligaram aos lipídeos de membrana dificultando a peroxidação lipídica e se ligaram a geleia real e ao ácido ascórbico dificultando seu efeito antioxidante (RAMANA e colab., 2017; SPENCER e SCHWARTZ, 2000).

4.9. Teste de produção de Espécies Reativas em Macrófagos

As nanopartículas de TiO₂ foram testadas para verificar sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio em cultura de macrófagos.

Os histogramas demonstram os resultados obtidos dos ensaios de espécies reativas em macrófagos. O indutor de ROS utilizado no ensaio foi o Zymosan e a atividade dos nanocristais de TiO₂ foram testados tanto isolados quanto combinados com o Zymosan a fim de verificar se eles causam estresse oxidativo ou não.

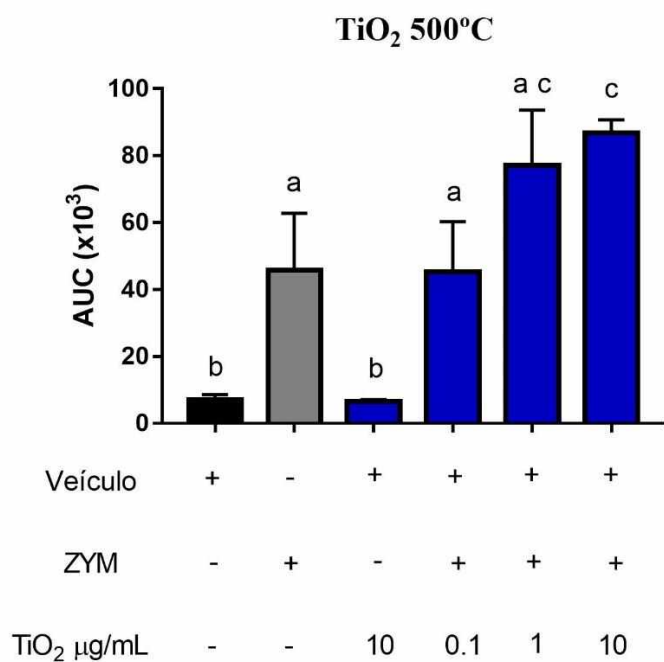


Figura 46: Histograma comparativo entre as amostras de TiO₂ tratadas a 500°C isoladas ou em conjunto com o zymosan. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

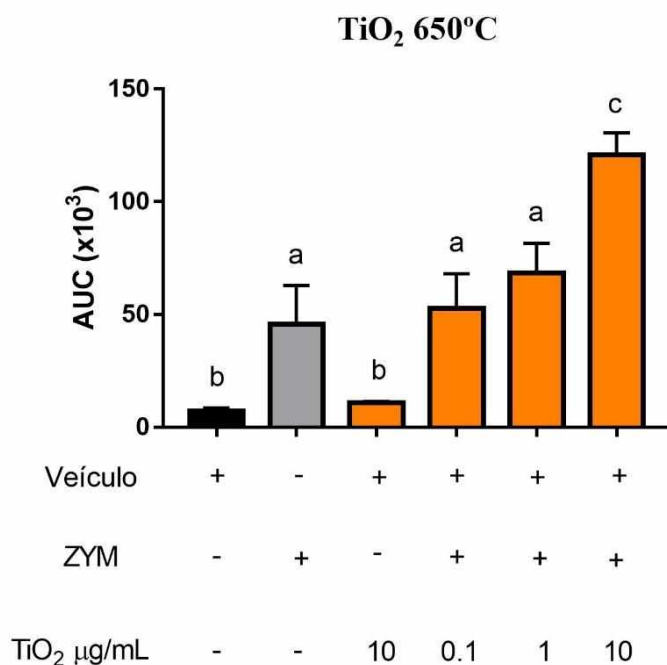


Figura 47: Histograma comparativo entre as amostras de TiO₂ tratadas a 650°C isoladas ou em conjunto com o zymosan. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).

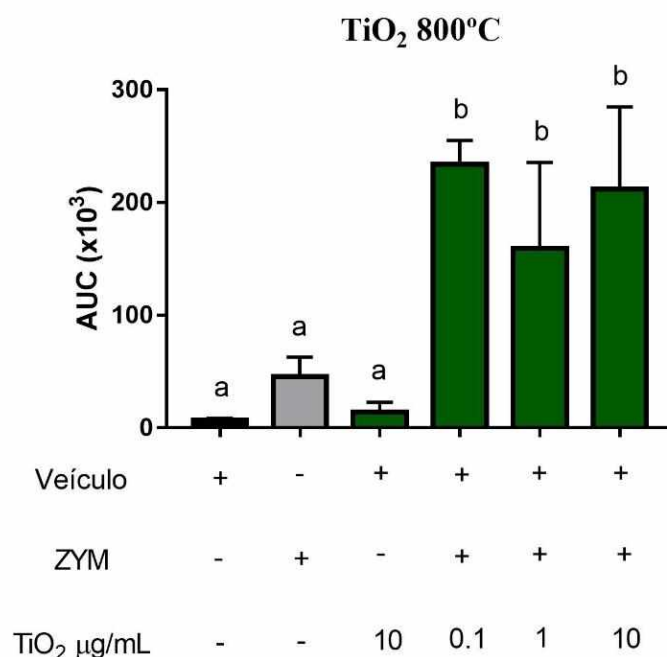


Figura 48: Histograma comparativo entre as amostras de TiO₂ tratadas a 800°C isoladas ou em conjunto com o zymosan. Não foi identificada significância coesa entre os valores da nanopartícula de TiO₂ 800°C, veículo e zymosan.

Ao analisar o efeito da nanopartícula de TiO₂ tratada à temperatura de 500°C, nota-se que isolada, não demonstrou produção de ROS em macrófagos, entretanto, combinada com o reagente indutor de espécies reativas, o Zymosan, a mesma potencializou seu efeito destrutivo.

Esse efeito potencializador da atividade do Zymosan foi identificado novamente no teste com as nanopartículas tratadas a 650°C e 800°C, embora as mesmas isoladas não tenham gerado espécies reativas.

O efeito potencializador do indutor de ROS Zymosan foi maior na concentração mais alta (10 µg/mL) das nanopartículas tratadas a 500°C e 650°C. Já na nanopartícula tratada a 800°C, o indutor zymosan teve seu efeito altamente potencializado nas concentrações de 0.1, 1 e 10 µg/mL.

Após os resultados obtidos nos testes biológicos, foi realizado a técnica de microscopia de força atômica (AFM) com a finalidade de descobrir alguma possível interação entre as nanopartículas de TiO₂ e o Zymosan.

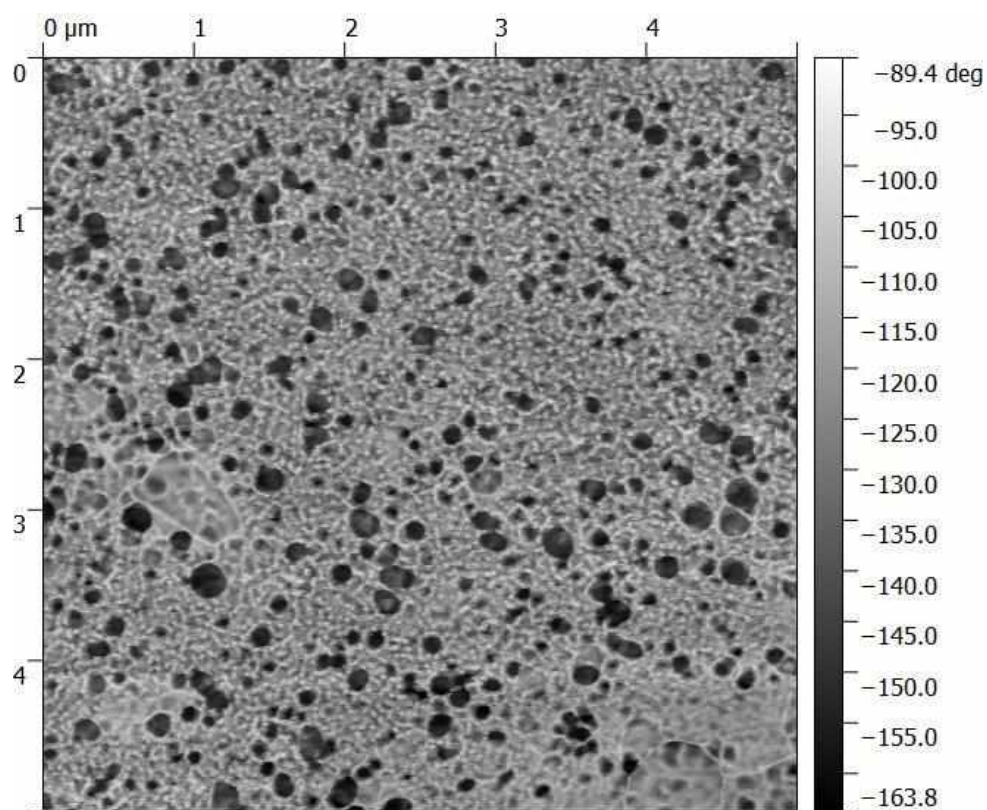


Figura 49: Análise de microscopia de força atômica do reagente Zymosan isolado.

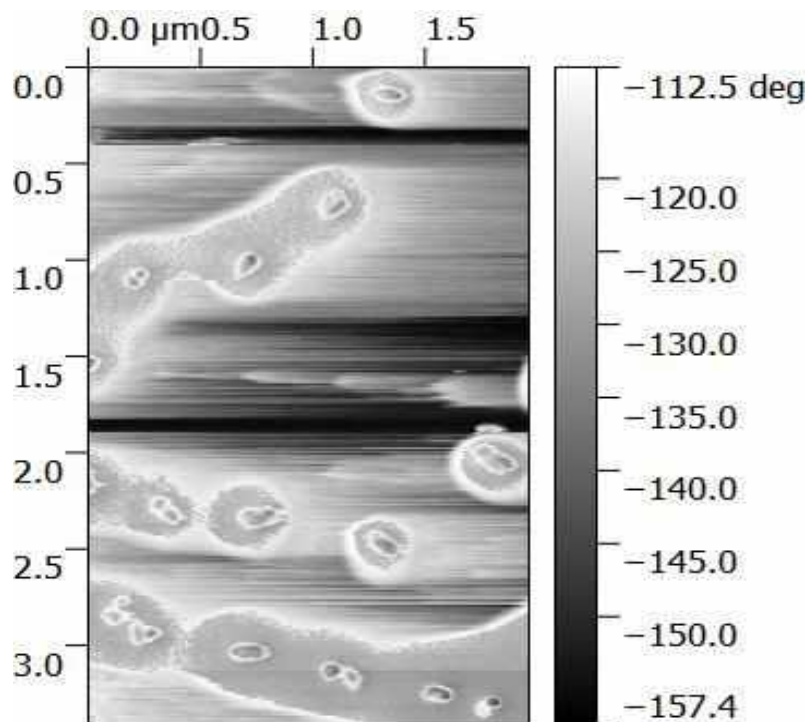


Figura 50: Análise de microscopia de força atômica das nanopartículas de TiO_2 isoladas.

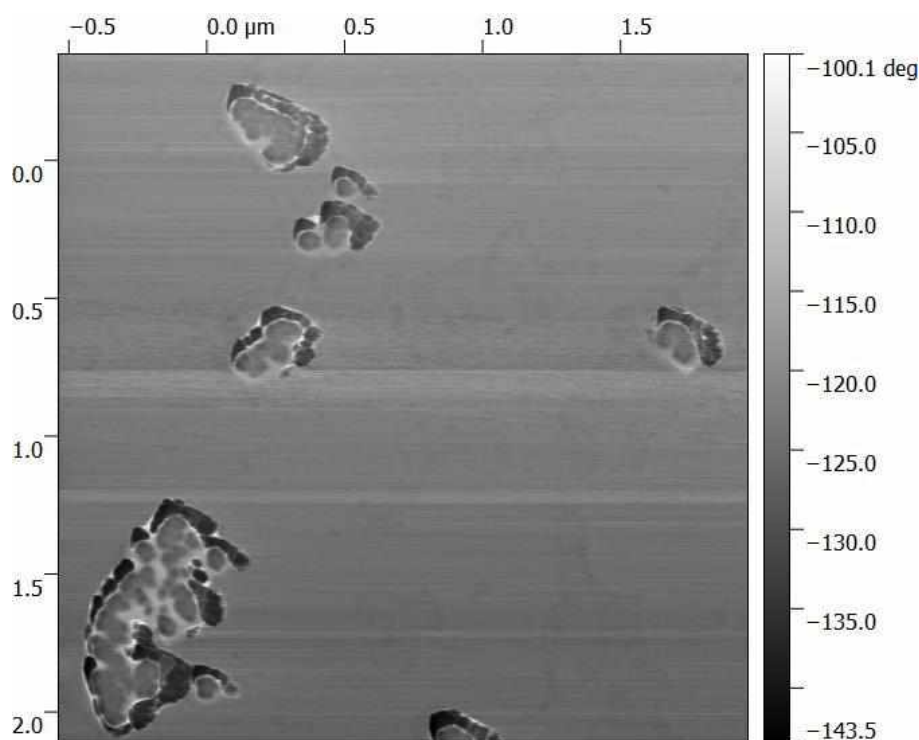


Figura 51: Análise de microscopia de força atômica do reagente Zymosan combinado com as nanopartículas de TiO_2 . As nanopartículas de TiO_2 são representadas pelas camadas brancas/cinzas e o Zymosan é representado pela camada mais escura que engloba a camada branca/cinza.

Como já mencionado, o titânio é um material bastante utilizado em implantes biomédicos e é altamente reativo, quando exposto ao ar ou em fluido é rapidamente transformado em uma camada de TiO_2 , essa camada entre o implante e o material biológico promove a resistência parcial à corrosão sob determinadas condições biológicas e a biocompatibilidade do titânio (BRUNO e colab., 2014).

A resistência à corrosão do titânio não é totalmente absoluta, ou seja, o material por mais “seguro” que seja, ainda sofre processos corrosivos. Esses processos fazem com que o titânio libere íons nos tecidos adjacentes causando possíveis danos. Pesquisas mostraram que foi encontrado titânio ligado iônica e covalentemente às biomoléculas de tecidos adjacentes ao implante, mostrando que houve corrosão do material implantado (MAKUMIRE e colab., 2014; YU e colab., 2015).

Já foi relatado que implantes de titânio possuem diversas biomoléculas, como polissacarídeos, proteínas e lipídeos ligadas em sua superfície que podem alterar a resistência à corrosão do material (YU e colab., 2015). É possível ver na Figura 51 que o

titânio reveste as moléculas de oxigênio nas nanopartículas de TiO_2 , portanto as biomoléculas interagiram com o titânio (LANDMANN e colab., 2012).

É fato científico que no local onde ocorre um processo inflamatório, ele se torne mais ácido. Essa acidificação é de alto risco para implantes metálicos que possuem biomoléculas ligadas em sua superfície, pois sua resistência à corrosão estará comprometida nesse meio, liberando mais íons provindos do implante e rompendo o biofilme de TiO_2 , podendo liberar titânio nas camadas adjacentes do material e devido a desestruturação das moléculas de TiO_2 , o Oxigênio interno é liberado no meio intracelular, sendo passível de sofrer oxidação e acabar gerando o ânion superóxido, promovendo maior estresse oxidativo (MAKUMIRE e colab., 2014; MORENO e colab., 2019; YU e colab., 2015).

Devido a esses fatos podemos perceber que o reagente Zymosan, constituído principalmente por polissacarídeos (73%), pode interagir fortemente com o titânio que reveste as nanopartículas de TiO_2 (GURZAWSKA e colab., 2012; LANDMANN e colab., 2012). Uma hipótese para o efeito devastador do titânio ligado ao zymosan é a de que ao se encontrarem eles formam um complexo entre TiO_2 + Zymosan, onde esse complexo irá causar maior dano a célula, através da liberação de mais espécies reativas de oxigênio.

Uma outra hipótese é a de que a interação dos polissacarídeos com o TiO_2 pode ter promovido um decaimento em sua resistência a corrosão e a resposta inflamatória causada pelo zymosan pode ter feito com que o meio ficasse levemente ácido, fazendo com que o titânio e o oxigênio se dissociassem, liberando mais moléculas de O_2 no meio, consequentemente favorecendo mais a produção do ânion superóxido e liberando titânio no meio intracelular, promovendo maior estresse oxidativo, levando a uma maior resposta inflamatória (BRUNO e colab., 2014; YU e colab., 2015).

5.0 Conclusão

Com os resultados apresentados podemos concluir que as nanopartículas de TiO_2 podem apresentar diferentes características dependendo do meio onde estão, pois foi relatado que as mesmas conseguem interagir com carboidratos e outras moléculas, e após um tempo no corpo, o titânio consegue se deslocar do local do implante e se alojar em órgãos e tecidos adjacentes ao implante, principalmente em situações onde o tecido está sobre determinada

resposta inflamatória, pois a acidificação do local inflamado pode alterar a resistência à corrosão das nanopartículas e liberar titânio do material nos tecidos adjacentes ao implante.

Isso não é ideal, pois a maior aplicação das nanopartículas é em implantes e próteses em humanos, e o fato de não se saber exatamente como essas nanopartículas irão se comportar é preocupante, pois são usadas em larga escala e em todo o mundo, assim, estudos aprofundados devem ser realizados para que as nanopartículas possam ser usadas com sabedoria e consciência, sem que nenhum órgão ou molécula do corpo se prejudique.

Foi possível concluir que as nanopartículas isoladas não possuem capacidade antioxidante e também atrapalharam o efeito antioxidante da geleia real, mostrando assim que não são antioxidantes por si só e não potencializaram o efeito antioxidante da geleia real em nenhum experimento realizado.

6. Referências Bibliográficas

A. J. HULBERT, NICOLAS MARTIN, MSc and Paul L. **LIPID PEROXIDATION AND ANIMAL LONGEVITY**. v. 51, p. 469–511, 2017.

A.C, Bandeira. **Nanopartículas Poliméricas e Interações com Macrófagos**. Dissertacao, p. 2016, 2016.

A.L.A. FERREIRA, L.S. MATSUBARA Departamento. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. p. 95–100, 2002.

ALVES, Clayton Q. e colab. **Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds**. Química Nova, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

ANDR, Carlos e colab. **Nanotecnologia em Drug Delivery Systems e a sua aplicação em terapêuticas anti-cancerígenas Nanotecnologia em Drug Delivery Systems e a sua aplicação em terapêuticas anti-cancerígenas**. 2016.

ANDRÉ, Filipe e SILVA, Nascimento. **e tiazóis utilizando o método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Orogênio)**. 2010.

ANDREOLI, Cristina e colab. **Critical issues in genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles by human peripheral blood mononuclear cells**. Journal of Applied Toxicology, v. 38, n. 12, p. 1471–1482, 2018.

ARAÚJO, Santos e CRISTINA, Verônica e DINIZ, De Souza. **Avaliação gap óptico do TiO₂ obtido pelo método Pechini : influência da variação das fases anatásio-rutilo**
Evaluation of the optical gap of TiO₂ Obtained by Pechini method : influence of the variation of the anatase-rutile phases. 2018.

BRUNETTE, Donald M. e colab. **Titanium in Medicine.** p. 1029, 2001.

BRUNO, Marcos E. e colab. **Impact through time of different sized titanium dioxide particles on biochemical and histopathological parameters.** Journal of Biomedical Materials Research - Part A, v. 102, n. 5, p. 1439–1448, 2014.

C. D. SCHNEIDER & A, R, Oliveira. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico.** v. 10, n. 9, p. 308–313, 2004.

CAMBRUSSI, Anallyne Nayara Carvalho Oliveira e colab. **The role of nanotechnology in reducing oxidative stress: a review Anallyne.** Informative Geum Bulletin, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2018.

CAPPELLETTI, Giuseppe e colab. **Photodegradation of pollutants in air: Enhanced properties of nano-TiO₂ prepared by ultrasound.** Nanoscale Research Letters, v. 4, n. 2, p. 97–105, 2009.

CHEN, Nan e colab. **The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots.** Biomaterials, v. 33, n. 5, p. 1238–1244, 2012.

CHEN, Qun e colab. **Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III.** Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 38, p. 36027–36031, 2003.

COSTA, A. C. F. M. e colab. **Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂.** Cerâmica, v. 52, n. 324, p. 255–259, 2006.

DECUZZI, Paolo e MITRAGOTRI, Samir. **Introduction to special issue on “Nanoparticles in Medicine: Targeting, Optimization and Clinical Applications”.** Bioengineering & Translational Medicine, v. 1, n. 1, p. 8–9, 2016.

DIEBOLD, Ulrike. <(Surf.Sci.Rep.)[2003]The surface science of titanium dioxide.pdf>. v. 48, n. x, 2002.

ESRA BIRBEN, UMIT MURAT SAHINER, CANSIN SACKESEN, SERPIL ERZURUM, And Omer Kalayci. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense.** v. 27, n. 1, p. 29–48, 2012.

FERNANDO, Luis e CHAVES, Mercês. **AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NOS ESPERMATOZOIDES**. v. 24, n. 1, p. 70–83, 2017.

GHANI, Ahsan e colab. **Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay**. Food Chemistry, v. 230, p. 195–207, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>>.

GURZAWSKA, Katarzyna e colab. **Nanocoating of titanium implant surfaces with organic molecules. Polysaccharides including glycosaminoglycans**. Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 8, n. 6, p. 1012–1024, 2012.

HSIAO, I. Lun e colab. **Indirect effects of TiO₂nanoparticle on neuron-glial cell interactions**. Chemico-Biological Interactions, v. 254, p. 34–44, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.024>>.

INOC, Rafael e colab. **DIÓXIDO DE TITÂNIO 1 – OBJETIVO 2 – INTRODUÇÃO 2 . 1 . Comportamento Fotofísico da Fluoresceína em Soluções Aquosas 3 – PARTE EXPERIMENTAL**. n. 1, p. 3–8, 2000.

IRIS F. F. BENZIE, 1 and J. J. Strain. **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”**: The FRAP Assay Iris. 1996.

JR, Landulfo Silveira. **Análise da concentração de etanol em amostras de álcool comerciais por espectroscopia Raman**. v. 2, n. 2018, p. 282–286, 2018.

KAMAT, Prashant V. **TiO₂ nanostructures: Recent physical chemistry advances**. Journal of Physical Chemistry C, v. 116, n. 22, p. 11849–11851, 2012.

KHAZAEI, Mozafar e ANSARIAN, Atefe e GHANBARI, Elham. **New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review**. Journal of Dietary Supplements, v. 15, n. 5, p. 757–775, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1363843>>.

LABILLE, Jérôme e BRANT, Jonathan. **Stability of nanoparticles in water**. Nanomedicine, v. 5, n. 6, p. 985–998, 2010.

LANDMANN, M. e RAULS, E. e SCHMIDT, W. G. **The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO₂**. Journal of Physics Condensed Matter, v. 24, n. 19, 2012.

LARKIN, Peter J. **IR and Raman Spectroscopy**. [S.l: s.n.], 2011. v. 9. Disponível em:
<<http://www.mdpi.com/2077-1444/9/10/297>>.

LE MOAL, Emmeran e colab. **Macrophage-derived superoxide production and antioxidant response following skeletal muscle injury**. Free Radical Biology and Medicine, v. 120, p. 33–40, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.024>>.

MAIRA, A. J. e colab. **Gas-phase photo-oxidation of toluene using nanometer-size TiO₂ catalysts**. Applied Catalysis B: Environmental, v. 29, n. 4, p. 327–336, 2001.

MAKUMIRE, Stanely e colab. **Immunomodulatory activity of zinc peroxide (ZnO₂) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles and their effects on DNA and protein integrity**. Toxicology Letters, v. 227, n. 1, p. 56–64, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.027>>.

MAURICIO, M D e colab. **Review Article Nanoparticles in Medicine : A Focus on Vascular Oxidative Stress**. v. 2018, 2018.

MESQUITA, Fernanda Cristina De e colab. **Avaliação da Frutose-1 , 6-bisfosfato na expressão da**. p. 164–166, 2010.

MORENO, Virginia e ZOUGAGH, Mohammed e RÍOS, Ángel. **Analytical nanometrological approach for screening and confirmation of titanium dioxide nano/micro-particles in sugary samples based on Raman spectroscopy – Capillary electrophoresis**. Analytica Chimica Acta, v. 1050, n. xxxx, p. 169–175, 2019.

MOSTÉFA-SBA, H. e DOMENICHINI, B. e BOURGEOIS, S. **Iron deposition on TiO₂(110): effect of the surface stoichiometry and roughness**. Surface Science, v. 437, n. 1, p. 107–115, 1999.

NAITO, Toshikazu YOSHIKAWA and Yuji. **What is oxidative stress?** Journal of Japan Medical Association Journal, v. 45, n. 7, p. 271–276, 2002. Disponível em:
<http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4649-8_1>.

NELSON, David L e COX, Michael M. **Lehninger**. [S.l: s.n.], 2013.

NOGUEIRA, Henrique Stelzer. **CÂNCER, SISTEMA IMUNOLÓGICO E EXERCÍCIO FÍSICO: UMA REVISÃO NARRATIVA**. v. 22, p. 42–4, 2018.

- OLIVEIRA, Aldaires e colab. **Antioxidant Power of Carotenoids , Flavonoids and Vitamin**. ReonFacema, v. 2, n. 4, p. 320–324, 2016.
- OM P. SHARMA, Tej K. Bhat. **DPPH antioxidant assay revisited Om**. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>>.
- PASUPULETI, Visweswara Rao e colab. **Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2017, 2017.
- PAVEL, Crenguța I. e colab. **Biological Activities of Royal Jelly - Review**. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, v. 44, n. 2, p. 108–118, 2011.
- POLIM, Materiais. **MEV-Aplicação e preparação de amostras.pdf**. 2007.
- PUPIM, Ferreira Antonio Aparecido. **MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA APLICADA EM IMUNOENSAIOS Antonio**. 2006.
- RAHIMI, Nazanin e PAX, Randolph A. e GRAY, Evan Mac A. **Review of functional titanium oxides. I: TiO₂ and its modifications**. Progress in Solid State Chemistry, v. 44, n. 3, p. 86–105, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.07.002>>.
- RAMANA, Kota V. e SRIVASTAVA, Sanjay e SINGHAL, Sharad S. **Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2017, p. 1–2, 2017.
- SCANDALIOS, J. G. **Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.
- SPENCER, Roxanne P. e SCHWARTZ, Jeffrey. **Titanium(III) reagents in carbohydrate chemistry: Glycal and C-glycoside synthesis**. Tetrahedron, v. 56, n. 15, p. 2103–2112, 2000.
- SUN, Hainan e YAN, Guizhen e ZHOU, Hongyu. **Bioactivity of Engineered Nanoparticles**. p. 63–79, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-5864-6>>.
- T.HUSSAIN,BIETAN, Y.YIN, F.BLACHIER, M.C.B.Tossou and N.Rahu. **Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?** 2016.

- TONIOLLI, Ricardo e COSTA, Jonathan Maia da S. **Espécies reativas ao oxigênio, antioxidantes e suas implicações na qualidade do sêmen criopreservado de mamíferos domésticos.** v. 16, n. 8, p. 22–29, 2017.
- TSUGITA, Misato e MORIMOTO, Nobuyuki e NAKAYAMA, Masafumi. **SiO₂ and TiO₂ nanoparticles synergistically trigger macrophage inflammatory responses.** Particle and Fibre Toxicology, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2017.
- TÚLIO, Marco e CAMPOS, Gomes. **Estresse oxidativo : fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial Oxidative stress : pathophysiology and laboratory diagnosis.** p. 1–8, 2017.
- VALKO, Marian e colab. **Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease.** [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2016. v. 90.
- WANG, Jie e ZHOU, Yingke e HU, Yuanyuan. **Facile synthesis of nanocrystalline TiO₂ mesoporous microspheres for lithium-ion batteries.** Journal of Physical Chemistry, p. 2529–2536, 2011.
- WILSON DE MELO CRUVINEL, Danilo Mesquita Júnior Júlio Antônio Pereira Araújo Tânia Tieko Takao Catelan Alexandre Wagner Silva de Souza Neusa Pereira da Silva Luís Eduardo Coelho Andrade. **Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** ARTIGO DE REVISÃO, v. 69, n. 2, p. 290–296, 2010.
- YAGI, Kunio. **Simple Assay for the Level of Total Lipid Peroxides in Serum or Plasma.** Free Radical and Antioxidant Protocols, v. 108, p. 101–106, 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1385/0-89603-472-0:101>>.
- YU, Fei e colab. **Lipopolysaccharide inhibits or accelerates biomedical titanium corrosion depending on environmental acidity.** International Journal of Oral Science, v. 7, n. 3, p. 179–186, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2014.76>>.
- ZHANG, Changbin e HE, Hong e TANAKA, Ken ichi. **Catalytic performance and mechanism of a Pt/TiO₂ catalyst for the oxidation of formaldehyde at room temperature.** Applied Catalysis B: Environmental, v. 65, n. 1–2, p. 37–43, 2006.