

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO - AFYA
INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - CAMPUS ZONA OESTE
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL -
BIOTRANS**

ANGELA DE OLIVEIRA ALEXANDRE

**ANÁLISE PREDITIVA DE DANO OCULAR POR NANOPARTÍCULAS EM
CÉLULAS SIRC PELAS TÉCNICAS DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA EM TEMPO
REAL E OECD TG 491**

DUQUE DE CAXIAS

2023

ANGELA DE OLIVEIRA ALEXANDRE

**ANÁLISE PREDITIVA DE DANO OCULAR POR NANOPARTÍCULAS EM
CÉLULAS SIRC PELAS TÉCNICAS DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA EM TEMPO
REAL E OECD TG 491**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional - BIOTRANS, Universidade do Grande Rio - AFYA, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO, Universidade Estadual do Rio de Janeiro- campus Zona Oeste – UERJ/ZO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores:

Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira (INMETRO)

Dr. José Mauro Granjeiro (INMETRO)

DUQUE DE CAXIAS

2023

ANGELA DE OLIVEIRA ALEXANDRE

**ANÁLISE PREDITIVA DE DANO OCULAR POR NANOPARTÍCULAS EM
CÉLULAS SIRC PELAS TÉCNICAS DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA EM TEMPO
REAL E OECD TG 491**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional - BIOTRANS, Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Universitário Estadual do Rio de Janeiro campus Zona Oeste – UERJ/ZO, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira (BIOTRANS/INMETRO) - orientador

Dr. Jose Mauro Granjeiro (BIOTRANS/INMETRO) - orientador

Dr. Celso Barbosa Sant'Anna (BIOTRANS/INMETRO) - membro interno

Dr^a: Ekeveliny Amabile Veschi (INMETRO) - membro externo

Dr^a. Paola Alejandra Cappelletti (BCRJ) - membro externo

Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes (INMETRO) - suplente

AGRADECIMENTOS

A Deus por agir de forma perfeita em cada parte da minha vida.

A minha família, avó Maria Lúcia, tios Fabiana Alexandre e Ely Angela Lira e prima Anna Carolina Alexandre, que estiveram ao meu lado e torceram por mim, em especial a minha mãe Adriana Alexandre, que sempre me apoiou e me aconselhou, que esteve comigo nos feriados e fins de semana no laboratório e dormia sentada de tanto me esperar. Além de ser uma mãe maravilhosa, sempre cuidou de tudo à nossa volta, fez e faz o papel de mãe e pai ao mesmo tempo. Deus é realmente maravilhoso, deu-me para superar a ausência de um pai, uma mulher como ela, que soube sempre preencher dignamente a falta dentro do meu coração. Obrigada pela batalha, pela exaustão, pelo desempenho e pela sua conduta digna de aplausos. Quando sentir orgulho de quem me tornei, sinta principalmente orgulho de tudo o que você fez para me criar, afinal sou sua filha e o resultado dos seus esforços e orientações. Eu te amo mãe.

A Marceli Leano que conheci no INMETRO durante a iniciação científica e hoje é minha amiga e afilhada de casamento. Obrigada por me ouvir nos momentos felizes e tristes, por mesmo de longe estar tão presente na minha vida, por confiar na nossa amizade, por fazer parte de muitos momentos significativos da minha história e ocupar uma posição tão importante na minha vida. A nossa amizade cresce a cada passo que damos juntas, mesmo com tantos desencontros e com todas as dificuldades que aparecem ao longo do caminho, não largamos a mão uma da outra. Por isso e muitas outras milhões de coisas que eu te aminho do tamanho do universo.

A Natália Valente, minha orientadora do TCC da graduação, banca da especialização, colega de trabalho e que se tornou uma grande amiga. Foi o motivo principal da minha escolha pela área que tanto amo e sigo com afimco e dedicação. Foi ela quem pegou na minha mão no fluxo laminar e me guiou para um caminho tão especial, o da cultura celular e dos métodos alternativos ao uso de animais de laboratório. Obrigada por tanto.

Ao meu amigo de trabalho Wanderson de Souza que hoje se tornou um grande amigo e que levarei para a vida. Aprendi muito com ele ao longo do percurso e tê-lo ao meu lado no mestrado foi de extrema importância, tudo ficou mais claro, menos complicado e mais leve. Obrigada pelo apoio, conselhos, dedicação e por contribuir para minha formação profissional e acadêmica de forma tão significativa.

Aos meus orientadores Dr. Leonardo Boldrini e Dr. Jose Granjeiro, por terem acreditado em mim desde o primeiro momento, por todas as oportunidades dadas a mim ao longo do mestrado, e além, pois estaremos juntos no doutorado, por terem me dado as melhores condições para que fosse possível concluir o projeto. É uma grande honra trabalhar ao lado de profissionais esplêndidos, sem os senhores nada disso seria factível.

Aos pesquisadores, alunos e funcionários do LABIO, sem a ajuda de todos eles, juntamente com toda estrutura do laboratório não seria possível a execução deste trabalho de pesquisa. Sou imensamente agradecida por tudo e todos.

Ao BIOTRANS pela oportunidade da execução deste projeto, pelo corpo docente de excelência que contribuiu imensamente para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação por todo apoio financeiro.

DEDICATÓRIA

A Luan Rodrigues, um excelente amigo desde os 6 anos de idade até os seus 28 anos, tive o prazer de viver ao seu lado em cada fase desafiadora, a infância, a adolescência e o início da vida adulta. Juntos, brincamos na rua e de videogame, saímos, rimos, choramos, aprendemos e comemoramos cada etapa de nossas vidas. Sempre torceu por mim, seja na vida pessoal ou acadêmica, confiou e acreditou no meu potencial, contudo, dedico o meu mestrado e todas as próximas conquistas a ele. Amigo você é insubstituível, guardarei com muito amor todos os nossos momentos, você não fez só parte da minha história, você é parte da minha vida. Eu te amo para sempre.

A Maria Eugênia Barreiros, mulher extraordinária e mãe leoa. Tive o prazer de conhecer e conviver com ela, uma das pessoas que mais torceu e me defendeu na vida. Ela comemorava por cada vitória minha e fazia questão de deixar bem claro o quanto se orgulhava de mim, “minha Anjinha tirou 10 no TCC, nem eu tirei”. Extremamente inteligente, era matemática e fazia contas rápidas de cabeça, concursada, empoderada, uma mulher de opinião forte e muito admirável. “Mãezoca”, obrigada por tudo que fez por mim.

A Luise Barreiros, irmã e amiga. Filha da Maria Eugênia e mãe do Gabriel, começou arquitetura e urbanismo, mas todos nós sabíamos que a sua verdadeira paixão era a nutrição e realmente era, trocou o curso e concluiu sua graduação em nutrição. Foi uma mulher cheia de vida, de opinião forte e ao mesmo tempo uma pessoa muito sensível e animada. Depois do falecimento da sua mãe, foi quase que insuportável te perder para uma doença tão séria, silenciosa e negligenciada, apenas Deus sabe o tamanho da sua dor. Sempre será a nossa corujinha magricela.

“Nunca despreze as pessoas deprimidas. A depressão é o último estágio da dor humana.”

Augusto Cury

“Amizade só faz sentido se traz o céu para mais perto da gente, e se inaugura aqui mesmo o seu começo.”

Chico Xavier

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível, se torna realidade.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS	13
1.2	NANOTECNOLOGIA	14
1.2.1	ÓXIDO DE ZINCO (ZnO)	17
1.2.2	DIÓXIDO DE CÉRIO (CeO ₂)	18
1.3	MÉTODO <i>IN VITRO</i> DE TRIAGEM DA TOXICIDADE	18
1.3.1	IMPEDÂNCIA ELÉTRICA EM TEMPO REAL	19
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CeO ₂ E ZnO	23
4.1.1	DISPERSÃO DE LUZ DINÂMICA (DLS)	23
4.1.2	POTENCIAL ZETA	24
4.1.3	TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X DISPERSIVOS DE ENERGIA (EDS)	24
4.1.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	24
4.1.5	TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIO X (DRX)	24
4.2	IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO TG 491 DA OECD	25
4.2.1	MODELO BIOLÓGICO	25
4.2.2	PLAQUEAMENTO	26
4.2.3	EXPOSIÇÃO	26
4.2.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT	26
4.2.5	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	27
4.3	AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DE NPs PELA TG 491 DA OECD	27
4.4	TÉCNICA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA	28
5	RESULTADOS	29
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CeO ₂ E ZnO	29
5.1.1	DISPERSÃO DE LUZ DINÂMICA (DLS)	29
5.1.2	POTENCIAL ZETA	29
5.1.3	TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X DISPERSIVOS DE ENERGIA (EDS)	30
5.1.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	31
5.1.5	TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIO X (DRX)	31
5.2	TESTE DE PROFICIÊNCIA DO ENSAIO 491 DA OECD	32
5.2.1	SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO CATEGORIA 1	32
5.2.2	SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO SEM CATEGORIA	33
5.2.3	SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO SEM PREVISÃO	33
5.3	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA TG 491 PARA AS NPs DE ZnO E CeO ₂	34

5.3.1	<i>AVALIAÇÃO DAS NPs DE ZnO e CeO₂ EM 5 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO</i>	34
5.3.2	<i>AVALIAÇÃO DAS NPs DE ZnO e CeO₂ EM 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO</i>	35
5.4	<i>AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NPs DE CeO₂ E ZnO UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA</i>	35
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	39
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7.	APÊNDICE 1	49
8.	ANEXO 1	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3R: *Replacement; Refinement; Reduction*

BSA: Albumina Sérica

CaO: Óxido de Cálcio

CAS RN: *Registry Number Chemical Abstracts Service*

CC: Controle colorimétrico

CeO₂: Dióxido de Cério

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CP: Controle positivo

CSOM: Controle do óleo mineral

CSS: Controle da solução salina

DLS: Dispersão de luz dinâmica

DO: Densidade Óptica

D-PBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

DRX: Técnica de Difração de Raio X

ECIS: Sensor de Impedância de Substrato de Célula Elétrica

EDS: Técnica de Espectroscopia de Raios X Dispersivos de Energia

EHS: *Environment, Health and Safety*

HPPC: Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

IATA: Introdução às Abordagens Integradas de Teste e Avaliação

IC: índice celular

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LABIO: Laboratório de Biologia de Células Eucariontes

MEM: *Essencial Mínimo de Eagle*

MET: Microscópio eletrônico transmissão

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

MgO: Óxido de Magnésio

MTT: *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*

NEs: Nanoestruturas

NM: Nanomateriais

NPs: Nanopartículas

OECD TG 491: *Organization for Economic Cooperation e Development - Test Guideline 491*

Ohm: unidade de medida de resistência elétrica

PdI: índice de polidispersão

RTCA: analisador de células em tempo real

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

SFB: Soro Feral Bovino

SIRC: *Statens Serun Institut Rabbit Cornea*

STE: *Short Time Exposure*

UN GHS: *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*

Z0: resistência do branco

Zi: resistência em um ponto de tempo individual

ZnO: Óxido de Zinco

RESUMO

Os produtos de base nanotecnológica estão sendo cada vez mais utilizados na indústria de consumo, como produtos farmacêuticos, alimentícios, medicina, cosméticos e pesticidas. Destacamos as NPs de CeO₂ utilizadas em protetores solares, cosméticos, em agentes de polimento de vidro, em aditivos para diesel e cigarros e as NPs de ZnO, que têm uma ampla utilização na área biomédica devido à sua ação antimicrobiana e é matéria-prima para protetores solares e cosméticos. Tais NPs podem causar efeitos adversos à saúde humana, incluindo irritação e corrosão ocular. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é analisar a citotoxicidade ocular induzida pelas NPs de CeO₂ e ZnO, utilizando técnicas complementares de MTT e impedância elétrica. Para realizar a caracterização das NPs foram realizadas as técnicas de DLS onde tamanho médio e o índice de polidispersão das NPs de CeO₂ (em água) foi de $212,29 \pm 15,38$, Após 24 horas de estabilização, apresentou-se em $140,02 \pm 4,26$ nm. O ZnO (em água) foi de $241,20 \pm 11,49$ nm, após 24 horas de estabilização, apresentou-se em $188,90 \pm 42,68$ nm. Já o ZETA comprovou a estabilidade da suspensão com o valor superior a 25 mV, após adição do meio de cultura rico em proteínas, a carga superficial passou a se apresentar negativa. O EDS comprovou a composição elementar das NPs por MEV. MET estimou o fator de forma onde as NPs de CeO₂ se apresentam com morfologias poliédricas e irregulares e o ZnO possuem sua forma prevalente hexagonal e DRX para determinação e confirmação da sua natureza cristalina. O ensaio de proficiência avaliou a citotoxicidade por MTT de dez substâncias químicas já definidas, nas concentrações de 5% e 0,05%, as substâncias foram classificadas em Categoria 1, Sem Categoria e Sem Previsão de acordo com o UN GHS. Viabilidade celular relativa foi avaliada por MTT em 5 minutos e 24 horas utilizando as NPs de CeO₂ e ZnO nas concentrações de 1, 12, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL, em nenhuma condição a DO indicou menos de 70% de viabilidade celular, incluindo o controle colorimétrico (sem célula) com a DO acima de 80%. Adicionalmente, o índice celular, através da técnica de impedância elétrica, foi analisado durante 48 horas de exposição, sob as mesmas condições de NPs, o CeO₂ não apresentou toxicidade, já o ZnO, contrapondo os resultados de MTT, a partir da concentração de 50 µg/mL e juntamente com o controle colorimétrico, apresentaram redução significativa do índice celular, ficando próximo ao resultado do controle positivo, o que é um indicativo de toxicidade. Os ensaios de citotoxicidade são principalmente de natureza óptica, dependem de análise colorimétrica para quantificação dos ensaios. As NPs devido a sua natureza físico-química podem interferir diretamente na leitura do ensaio, comprometendo diretamente no resultado. O estudo ressalta a importância de utilizar métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa toxicológica, especialmente no contexto da crescente utilização de NPs em diversos produtos. A implementação de técnicas como a impedância elétrica não apenas se alinha com os princípios éticos dos 3R, como também traz menos variabilidade, comparado a métodos tradicionais.

Palavras-chaves: Toxicologia; Nanotoxicologia; Nanopartículas; Biotecnologia; Métodos Alternativos ao uso de Animais; Óxido de Zinco; Dióxido de Cério.

ABSTRACT

Nanotechnology-based products are increasingly being used in the consumer industry, such as pharmaceuticals, food, medicine, cosmetics and pesticides. We highlight CeO₂ NPs used in sunscreens, cosmetics, glass polishing agents, additives for diesel and cigarettes and ZnO NPs, which have wide use in the biomedical area due to their antimicrobial action and are the raw material for sunscreens and cosmetics. NPs can be air pollution agents, which can cause adverse effects on human health, including eye irritation and corrosion. In this context, the objective of this work is to analyze the ocular cytotoxicity induced by CeO₂ and ZnO NPs, using complementary MTT and electrical impedance techniques. To carry out the characterization of NPs, DLS techniques were carried out where the average size and polydispersity index of CeO₂ NPs (in water) was 212.29 ± 15.38 . After 24 hours of stabilization, it was 140.02 ± 4.26 nm. ZnO (in water) was 241.20 ± 11.49 nm, after 24 hours of stabilization, it was 188.90 ± 42.68 nm. ZETA proved the stability of the suspension with a value above 25 mV. After adding the protein-rich culture medium, the surface charge became negative. EDS confirmed the elemental composition of NPs by SEM. TEM estimated the shape factor where CeO₂ NPs have polyhedral and irregular morphologies and ZnO has its prevalent exagonal shape and XRD to determine and confirm its crystalline nature. The proficiency test evaluated the MTT cytotoxicity of ten already defined chemical substances, at concentrations of 5% and 0.05%, the substances were classified as Category 1, No Category and No Forecast in accordance with the UN GHS. Relative cell viability was assessed by MTT at 5 minutes and 24 hours using CeO₂ and ZnO NPs at concentrations of 1, 12, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL, under no condition did the OD indicate less than 70% of cell viability, including colorimetric control (without cells) with OD above 80%. Additionally, the cellular index, using the electrical impedance technique, was analyzed during 48 hours of exposure, under the same conditions as NPs, CeO₂ did not present toxicity, whereas ZnO, in contrast to the MTT results, from a concentration of 50 µg/mL and together with the colorimetric control, they showed a significant reduction in the cellular index, close to the result of the positive control, which is an indication of toxicity. Cytotoxicity assays are mainly optical in nature and depend on colorimetric analysis to quantify the assays. NPs, due to their physicochemical nature, can directly interfere with the reading of the assay, directly compromising the result. The study highlights the importance of using alternative methods to the use of animals in toxicological research, especially in the context of the increasing use of NPs in various products. The implementation of techniques such as electrical impedance not only aligns with 3R ethical principles, but also brings less variability compared to traditional methods.

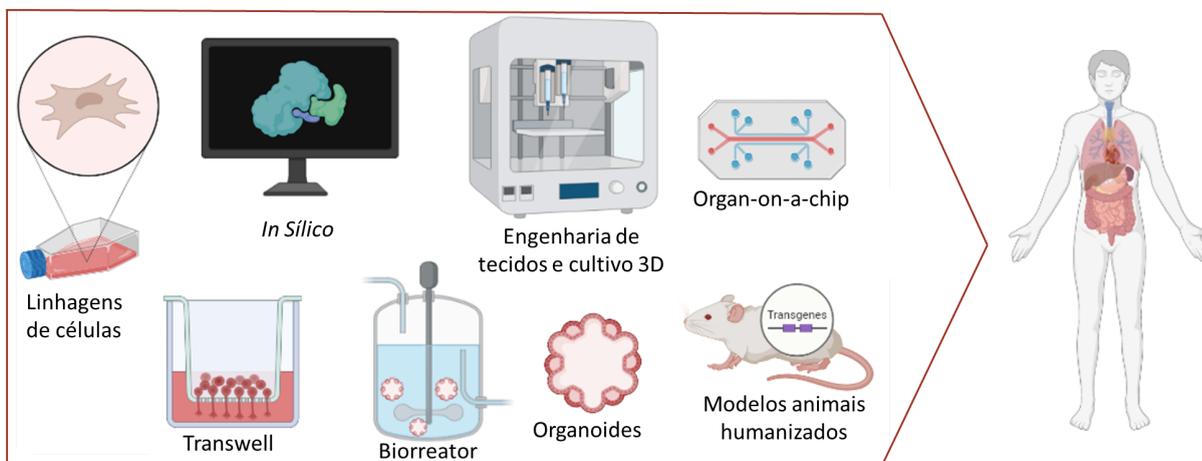
Keywords: Toxicology; Nanotoxicology; Nanoparticles; Biotechnology; Alternative Methods to the use of Animals; Zinc oxide; Cerium Dioxide

1 INTRODUÇÃO

1.1 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

A discussão sobre a necessidade de métodos alternativos à experimentação animal no meio científico tem ganhado relevância mundial, impulsionada principalmente por considerações éticas, econômicas e legislativas. Do ponto de vista ético, a adoção dos princípios dos 3R (*Replacement, Refinement, Reduction*) vem se fortalecendo, visando reduzir o uso de animais em pesquisas, conforme ilustrado na Figura 1 (TAKAHASHI Y. et al., 2008; SCHEEL J. et al., 2011; VERSTRAELEN S. et al., 2013). No aspecto econômico, os custos envolvidos na aquisição, transporte, cuidado e manutenção de animais são significativos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). Além disso, diretrizes estabelecidas por órgãos regulatórios brasileiros têm incentivado o uso de métodos alternativos que reduzam a dependência de animais em pesquisas científicas (DALBEN D., EMMEL J.L., 2013).

Figura 1: Métodos Alternativos ao uso de Animais na Pesquisa Prática dos 3R (*Replacement; Refinement; Reduction*). Diversas metodologias alternativas e relevância fisiológica das plataformas de cultura de tecidos *in vitro* para mimetizar o organismo humano. As tecnologias *in vitro* têm certos papéis em diferentes fases do processo da pesquisa científica.

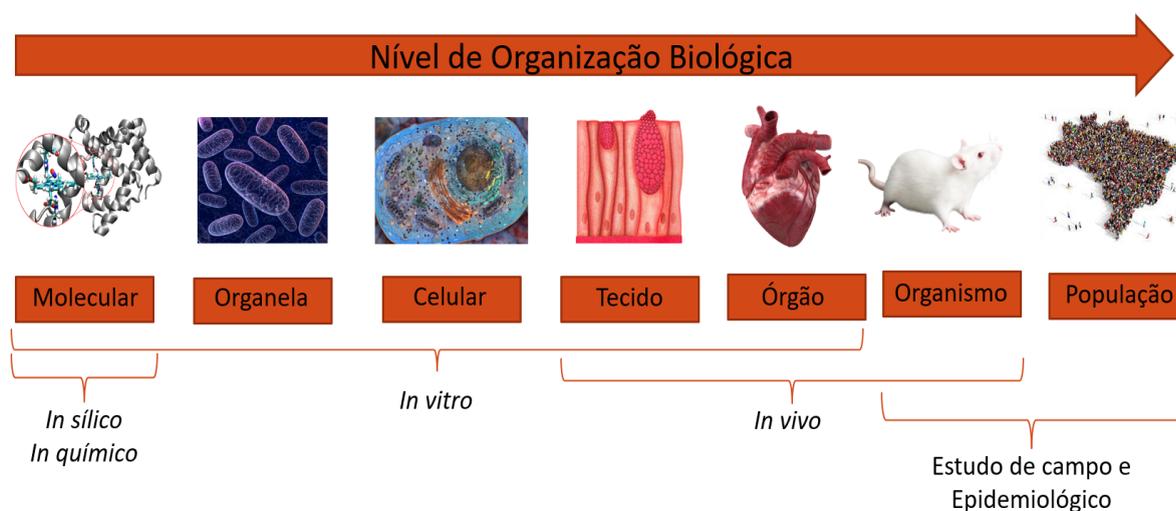


Fonte: Modificado de JALILI-FIROOZINEZHAD, S. et al., 2021 e OECD, 2019.

No Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) desempenha um papel fundamental na ética do bem-estar animal na ciência brasileira. As resoluções normativas nº 17, 18 e 31, emitidas pelo CONCEA, reconhecem e endossam no país o uso de métodos alternativos já validados. Estas resoluções estipulam a substituição das metodologias clássicas que utilizam animais por métodos alternativos, definindo um prazo de até cinco anos para essa transição, a partir da data de sua publicação (CONCEA, 2014; 2016).

Além disso, os trabalhos de HOFFMANN S. et al., (2008) e ADRIAENS et al., (2017) destacam que a combinação estratégica de diferentes ensaios, conforme recomendado no Documento de Orientação sobre uma Abordagem Integrada de Testes e Avaliações (IATA 263) da OECD (2017), aumenta a eficácia preditiva dos métodos alternativos (Figura 2).

Figura 2: Introdução às Abordagens Integradas de Teste e Avaliação (IATA). Abordagens que combinam a revisão de dados disponíveis em literatura e em análises *in silico*, *in químico*, *in vitro*, tecidos, entre outros para a avaliação toxicológica.

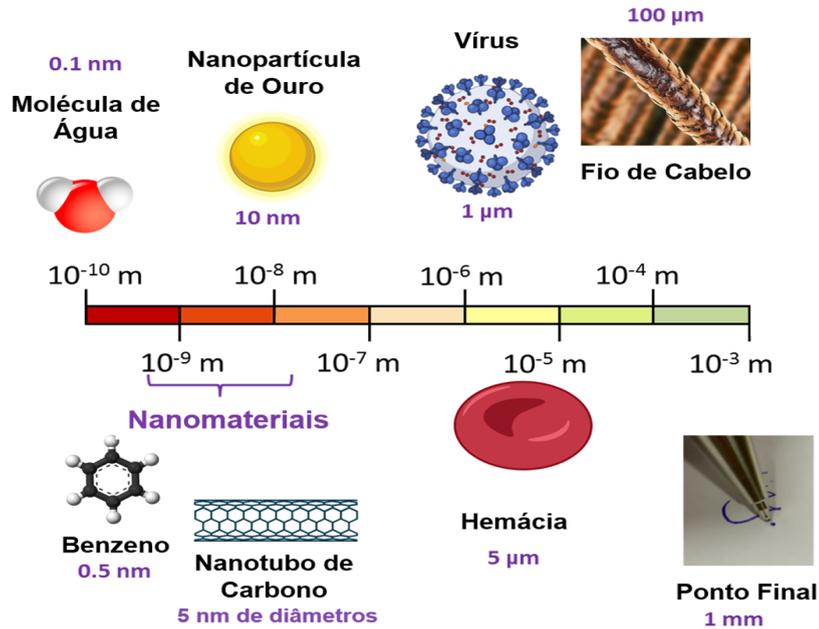


Fonte: Modificado de OECD, 2017.

1.2 NANOTECNOLOGIA

A Nanotecnologia envolve o estudo, produção e aplicação de estruturas na escala nanométrica (Figura 3). Apesar de ser um campo de conhecimento relativamente recente, o conceito de nanotecnologia retoma a tempos antigos, sendo utilizado para descrever nanoprodutos que existem presentes na humanidade há séculos. Exemplos históricos incluem partículas metálicas, especialmente de ouro e prata, encontradas em vitrais e vasilhames da Idade Média (GOESMANN e FELDMANN, 2010) (Figura 4).

Figura 3: Esquema de representação de uma escala de comprimento para contextualização de nanomateriais.



Fonte: Modificado de GOESMANN e FELDMANN, 2010.

Atualmente, nanomateriais (NM) são amplamente aplicados, sendo encontrados desde as indústrias de eletrônicos, passando pelas indústrias de bens de consumo e chegando à área médica. A aplicação desses materiais ganhou tal proporção, que surgiram novas áreas de conhecimento como a nanotoxicologia e a nanomedicina, evidenciando a inserção da nanotecnologia em questões ambientais e de saúde (PATIL, MP. *et al.*, 2019).

Figura 4: Cálice de Licurgo. Cálice fica verde quando iluminado pela frente e vermelho quando iluminado por trás devido a nanopartículas de ouro e prata.



Fonte: BRITISH MUSEUM, 2022.

A nanotecnologia oferece abordagens únicas para manipular uma ampla gama de processos biológicos e médicos que ocorrem em escalas nanométricas, com um impacto significativo e promissor na biologia e medicina (ZANDONELLA, 2003). Este campo é uma das áreas de pesquisa mais dinâmicas na ciência moderna dos materiais (YOUSEF; DANIAL, 2012). A nanotecnologia possibilita uma variedade de aplicações inovadoras (Figura 5), abrangendo desde o desenvolvimento de novos compostos para tecidos, passando pelo processamento de alimentos e produção agrícola, até o alcance de técnicas médicas avançadas (SAHOO, 2010).

Figura 5: Esquema representativo das áreas de aplicação das Nanoestruturas (NEs). O esquema demonstra os diversos setores em que as NEs são aplicadas na sociedade atual, mostrando a sua versatilidade e importância.



Fonte: FERREIRA, V.B., 2018.

À medida que os NM começaram a ser utilizados em aplicações comerciais, a *Organization for Economic Cooperation e Development* (OCDE) identificou a necessidade de analisar as potenciais preocupações de segurança causadas pelos nanomateriais fabricados. A *Environment, Health and Safety* (EHS) lançou um programa de trabalho em 2006 para garantir que as abordagens para avaliação de perigos, exposição e riscos para NM fabricados

sejam de alta qualidade, baseadas na ciência e harmonizadas internacionalmente (OECD, 2023).

1.2.1 ÓXIDO DE ZINCO (ZnO)

O Óxido de Zinco (ZnO) é um composto inorgânico amplamente utilizado em diversas aplicações do dia a dia. Foi classificado como seguro (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (NARLA, S. e LIM, H.W., 2020). Além de ser empregado como aditivo alimentar, principalmente em alimentos à base de cereais como fortificante (XIE et al., 2011), o ZnO ganhou novas aplicações com o avanço da nanotecnologia, destacando-se por suas propriedades antimicrobianas. Como NM, o ZnO demonstrou eficácia na preservação de alimentos, graças a estas propriedades (ESPITIA et al., 2012).

Devido a essas propriedades antimicrobianas, o ZnO tem sido incorporado a revestimentos de latas de alimentos e embalagens para conservar peixes, carnes e condimentos, ajudando a preservar as cores e prevenir a deterioração. Além disso, é utilizado como matéria-prima em protetores solares e cosméticos (XIE et al., 2011; NARLA, S. e LIM, H.W., 2020). Os estudos sobre o efeito antimicrobiano do ZnO começaram na década de 1950, mas foi somente em 1995 que a eficácia do ZnO, juntamente com outros compostos como Óxido de Magnésio (MgO) e Óxido de Cálcio (CaO), contra algumas cepas bacterianas foi claramente demonstrada, consolidando seu uso como agente antimicrobiano (SAWAI, J., 2003 e SAWAI, J., et al., 1998).

1.2.2 DIÓXIDO DE CÉRIO (CeO₂)

Comercialmente, o Dióxido de Cério (CeO₂) é empregado em uma variedade de aplicações, incluindo como catalisador de craqueamento no refino de petróleo, para polimento de vidro e espelhos (especialmente em lentes oftálmicas), em semicondutores, células de combustível, e como aditivo em diesel e cigarros. As nanopartículas (NPs) de CeO₂ são usadas principalmente como aditivo de combustível diesel, visando aumentar a eficiência da combustão e reduzir as emissões de fuligem, atuando como catalisador (HEI Report 2001; CASSEE et al., 2011). Embora eficientes na captura de material particulado (fuligem), estudos com motores indicam que uma pequena quantidade de CeO₂ na forma de NPs pode escapar para o ambiente, potencialmente atuando como poluentes atmosféricos e causando efeitos adversos à saúde humana (CASSEE et al., 2011).

Os impactos ambientais e de saúde relacionados ao uso de NPs de CeO₂ ainda são pouco conhecidos. Até o momento, os efeitos potenciais das NPs de óxidos metálicos na saúde humana, seja por exposição acidental ou não no local de trabalho durante a produção, ou pela liberação no meio ambiente através de produtos, não foram extensivamente avaliados. É importante notar que o potencial de qualquer material para induzir efeitos adversos à saúde e ao ambiente depende tanto da sua toxicidade biológica quanto do nível de exposição (ROGERS, N. et al., 2010).

1.3 MÉTODO *IN VITRO* DE TRIAGEM DA TOXICIDADE

Para a avaliação do desfecho toxicológico de interesse alguns critérios devem ser considerados, como a escolha dos testes realizados, descrição do preparo da amostra, bem como identificação e/ou referência do protocolo ou metodologia adotados, definição e justificativa para dose e métrica de dose aplicada, eventuais adequações metodológicas realizadas, como também considerações relacionadas às limitações do método e a necessária adoção de outras metodologias (ANVISA, 2023).

A Resolução Normativa nº 31 descreve o método OECD TG 491 (*Organization for Economic Cooperation and Development - Test Guideline 491*), um teste *in vitro* de curta duração para danos oculares (CONCEA, 2016). Esta metodologia se baseia no uso de modelos experimentais que eliminam a necessidade de animais. Seu princípio é avaliar parâmetros de função celular após exposição a agentes irritantes, classificando o potencial citotóxico de substâncias químicas, como as NPs, que geralmente se correlaciona diretamente com o potencial de causar dano ocular, seja ele reversível ou não (LOTZ C. et al., 2016; WARHEIT, D.; 2018).

O teste de Exposição de Curta Duração (STE – *Short Time Exposure*) é um método alternativo *in vitro* para avaliar a irritação e a corrosão ocular. Desenvolvido por Takahashi em 2008, utiliza a linhagem celular SIRC (*Statens Serum Institut Rabbit Cornea*) em monocamada (cultura 2D) como modelo biológico e é um teste colorimétrico de citotoxicidade (OECD, 2015; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003). A redução da viabilidade celular indica o potencial citotóxico das substâncias químicas testadas nas células da córnea de coelhos e sua capacidade de irritar ou danificar a córnea e os olhos (TAKAHASHI Y, 2008; OECD, 2018).

A avaliação do potencial citotóxico de NPs é crucial, dada a crescente utilização dessas substâncias na formulação de produtos de consumo em vários setores industriais, incluindo Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), agrotóxicos, saneantes, e como partículas ambientais em produtos de construção e poluição do ar, entre outros, que podem entrar em contato com os olhos, intencionalmente ou não (WILHELMUS K.R., 2001; MEHRA N.K. et al.; 2016; OECD; 2014). No entanto, uma revisão focada nos efeitos da toxicidade dos NM nos olhos ainda é insuficiente (WARHEIT, D.; 2018; JEEVANANDAM, J. et al.; 2018).

Os testes de citotoxicidade são predominantemente ópticos e dependem de absorvância, luminescência ou fluorescência, ou seja, requerem análise colorimétrica para quantificação. As NPs podem interferir nos resultados desses testes devido à sua capacidade de absorver, dispersar e emitir luz (GUADAGNINI et al., 2015; OOSTINGH et al., 2011).

O método STE pode substituir experimentos *in vivo* com coelhos na avaliação toxicológica ocular. Contudo, a combinação estratégica deste com outras metodologias pode ser necessária para evitar completamente os testes *in vivo*. Assim, o STE e outros métodos *in vitro*, como a técnica de Impedância Elétrica, podem reforçar e promover a adoção de métodos alternativos e na classificação definitiva de produtos, substituindo métodos tradicionais, como o método de Draize, por exemplo (MCNAMEE P. et al., 2009; HAYASHI et al., 2012; VERSTRAELEN et al., 2013; OECD, 2018; PIERSMA A. H. et al., 2018; DRAIZE J. H. et al., 1944).

1.3.1 IMPEDÂNCIA ELÉTRICA EM TEMPO REAL

O Sensor de Impedância de Substrato de Célula Elétrica (ECIS) foi desenvolvido na década de 1980 para estudar processos biológicos em tempo real (GIAEVER e KEESE, 1991; TIRUPPATHI et al., 1992; ALEXANDER et al., 2013). Neste ensaio, células são cultivadas em poços que contêm um grande eletrodo de referência e vários eletrodos de detecção, cobrindo cerca de 80% da área de superfície do fundo de cada poço. Com a aplicação de um baixo potencial sinusoidal, mede-se a impedância eletroquímica entre os eletrodos. À medida que as células se aderem e se espalham na superfície do eletrodo, alteram a área disponível para o fluxo de corrente, aumentando a impedância do sistema (GIAEVER e KEESE, 1993). Esse aumento, observado nas células sobre os eletrodos de detecção, ocorre devido às suas membranas bilipídicas isolantes, que agem como dielétricos. Portanto, a impedância se

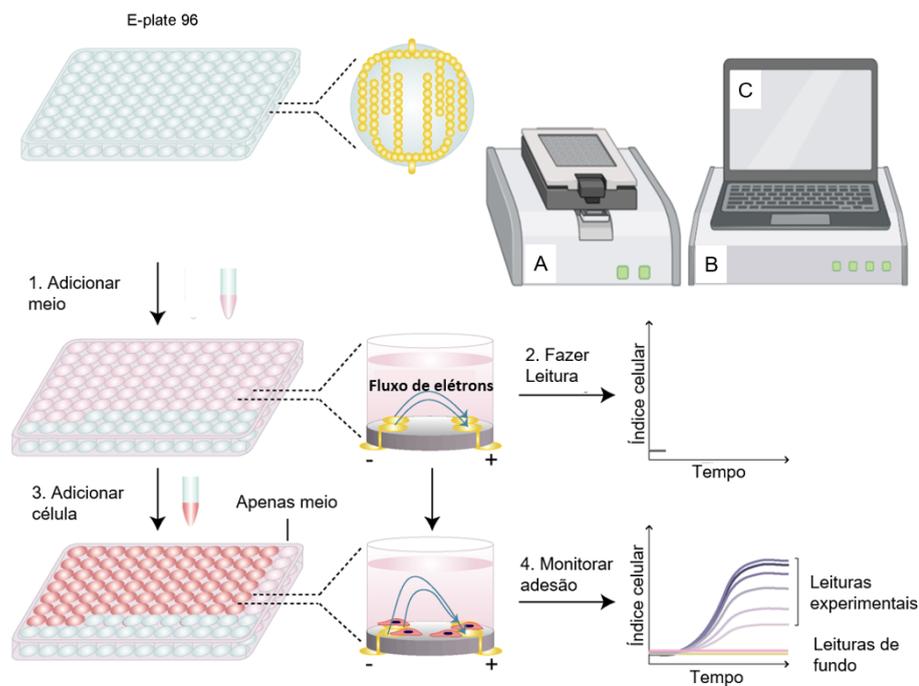
correlaciona com o número de células. A adição de um material de teste pode fazer com que células inviáveis se desprendam, resultando em uma queda da impedância e sugerindo toxicidade pela redução da viabilidade celular (Figura 6) (XIAO C. et al., 2002; XIAO C. e LUONG J. H., 2003; YEON J. H. e PARK J. K., 2005).

Além disso, a técnica de impedância eletroquímica permite avaliar diferenciação celular, invasão, migração, interação célula-célula em co-culturas e investigações mecanísticas, como alterações nos níveis intracelulares de cálcio e danos ao DNA (ERBAYKENT-TEPEDELEN et al., 2011; RAHIM S. e ÜREN A., 2011; KIM Y. R. et al., 2013; SZABO C. et al., 2013). Essa técnica também tem sido usada com sucesso para monitorar *in situ* a toxicidade celular induzida por NM e outros aspectos da fisiologia celular, como proliferação, morfologia e adesão intercelular (HONDROULIS et al., 2010).

Sistemas atuais como xCELLigence®, CellSine e ECIS (ECIS Z θ) são exemplos de instrumentos baseados em impedância eletroquímica usados para análise *in vitro* de toxicidade. Esses sistemas utilizam células monocamadas para monitorar mudanças nas propriedades de impedância após exposição a bioativos, incluindo NPs. As placas de cultura celular com eletrodos banhados a ouro no fundo dos poços permitem a observação de mudanças celulares em tempo real ao longo de um experimento (KE N. et al., 2011; SCRACE S. et al., 2013; YEON J. H.; PARK J. K., 2005).

Figura 6: Esquema simplificado do sistema xCELLigence RTCA para monitorar a adesão celular.

A. E-plate de 96 poços e os eletrodos de ouro embutidos em cada poço (vista superior de um único poço). (A) A placa é colocada dentro da estação do analisador de células em tempo real (RTCA), que é mantida em uma incubadora (B) e conectada ao analisador RTCA (C) e o fluxo de trabalho de um ensaio de adesão xCELLigence. (1) A leitura de fundo contendo apenas meio de cultura para se obter a resistência do branco (Z_0). (3) Uma vista lateral de um único poço demonstra o fluxo de elétrons partindo do terminal negativo para o positivo na presença apenas do meio, o que resulta em uma leitura de fundo baixa. (3) As células são adicionadas na placa para iniciar a leitura experimental para se obter a resistência em um ponto de tempo individual, fornecida pela presença de células aderidas (Z_i). (4) Aqui, uma vista lateral de um único poço demonstra o fluxo de elétrons impedido do terminal negativo para o positivo na presença de células aderentes, o que resulta no aumento da impedância ao longo do tempo à medida que mais células aderem e se espalham nos eletrodos gerando o índice celular.



Fonte: HAYASHI, K. *et al.*, 2017.

Considerando a controvérsia existente na literatura quanto a segurança de nanomateriais, a utilização de métodos normatizados no contexto de um sistema de gestão da qualidade, como a ABNT-NBR-ISO 17025:2017 e as Boas Práticas de Laboratório (BPL), que tenham sido formalmente validados (Doc-Cgre008) utilizando métodos de triagem da toxicidade para nanomateriais manufaturados (ABNT-ISO-TR-16197) e avaliação de risco (ISO-TR-13121), como a impedância elétrica (ISO/TS 21633:2021), tem se mostrado uma estratégia relevante. Ainda, o uso de métodos alternativos ao uso de animais tem mostrado maior relevância humana e consideração ética. Especificamente no contexto da toxicidade das

nanopartículas de óxido de zinco, dióxido de cério e óxido de grafeno, pelo grande número de desses NMs atualmente emergentes no mercado.

Consequências de NMs a saúde e o ambiente podem ensejar a percepção de risco e um aumento considerável na atenção recebida por estes NMs, permitindo seu aprimoramento em materiais benignos devido à suas propriedades físicas, químicas e elétricas ajustáveis e de fácil manuseio. Uma ênfase e uma avaliação mais cautelosas deste NM podem evitar contratempos causados pelo manuseio imprudente, fazendo com que a dose de exposição seja controlada e otimizada em suas aplicações biomédicas. A técnica de impedância elétrica, a partir da ISO/TS 21633:2021 pode, portanto, ser usada como um sistema de ensaio alternativo para o estudo da viabilidade e toxicidade de NPs *in vitro* sem interferência e pretendemos, a partir do Doc-Cgcre008, validar sua adequação para a análise da toxicidade ocular utilizando as células SIRC.

2 JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por métodos alternativos à experimentação animal, especialmente no campo da toxicologia, evidencia a necessidade de avanços tecnológicos significativos. Este movimento é impulsionado por uma combinação de fatores éticos, científicos, financeiros, comerciais e legislativos, com ênfase na implementação dos princípios dos 3R - *Replacement* (Substituição), *Refinement* (Aprimoramento) e *Reduction* (Redução). Essa abordagem é crucial no contexto do uso crescente de NPs em diversos produtos, onde a avaliação precisa da toxicidade ocular dessas partículas se torna cada vez mais relevante.

Neste cenário, a presente dissertação se destaca por sua originalidade e pertinência, abordando a implementação e a avaliação do teste de STE. Este teste é reconhecido por sua simplicidade, rapidez e baixo custo, sendo aplicável a substâncias solúveis e insolúveis em água. Contudo, a interferência de algumas NPs nas propriedades ópticas dos ensaios colorimétricos convencionais pode conduzir a resultados imprecisos, destacando a necessidade de métodos alternativos como a impedância elétrica. Esta técnica, que independe de medições ópticas, oferece informações cinéticas detalhadas de forma não invasiva e com alta resolução temporal, por meio de curvas de crescimento celular.

O objetivo central deste estudo é, portanto, explorar a eficácia da técnica de impedância elétrica como um método alternativo para a avaliação da viabilidade e toxicidade de NPs *in vitro*, sem as limitações dos ensaios colorimétricos tradicionais. Além disso, busca-se

comparar as conclusões obtidas por este método com aquelas geradas pelo guia OECD TG 491, proporcionando um novo caminho para a toxicologia ocular que alinha avanços científicos com a ética na pesquisa. A relevância deste estudo reside não apenas em seu potencial para reduzir a dependência de modelos animais, mas também na contribuição para a compreensão mais precisa da segurança de materiais em nanoescala, um aspecto crítico no avanço da ciência dos materiais e da saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste estudo é implementar e avaliar a eficácia do ensaio STE de acordo com o guia TG 491 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) no Laboratório de Biologia de Células Eucariontes (LABIO) do INMETRO. Paralelamente, o estudo tem como foco analisar a citotoxicidade ocular induzida pelas NPs de CeO₂ e ZnO, utilizando técnicas complementares de MTT e impedância elétrica. Este objetivo engloba a comparação e correlação entre os resultados obtidos por estas metodologias, com o intuito de avaliar a precisão e preditividade dos métodos de ensaio em determinar a toxicidade ocular de nanopartículas em um modelo *in vitro*. A finalidade é fornecer uma base científica robusta para a possível adoção destas técnicas como métodos alternativos aos testes em animais, visando contribuir para o avanço da toxicologia ocular e nanotoxicologia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Implementar o protocolo TG 491 da OECD;
- II. Aplicar a metodologia implementada às nanopartículas (NPs) de Dióxido de Cério e Óxido de Zinco (ZnO);
- III. Analisar a toxicidade das NPs de CeO₂ e ZnO, empregando a técnica de MTT por 5 minutos e 24 horas com células SIRC;
- IV. Avaliar a toxicidade das NPs de CeO₂ e ZnO, utilizando a técnica de impedância elétrica por 48 horas com células SIRC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CeO₂ e ZnO

4.1.1 DISPERSÃO DE LUZ DINÂMICA (DLS)

As NPs utilizadas foram adquiridas do Joint Research Center (JCR), as NPs de ZnO JCRNM-110, com tamanho primário declarado da partícula de <2 nm, no estado em pó, cor branca e com concentração de 100 mg/mL. As NPs de CeO₂ JRCNM-212 em tamanho primário <15 nm, foram adquiridas da JCR, no estado em pó, cor creme e concentração de 100 mg/mL.

As amostras foram dispersas por meio de agitação promovida por energia ultrassônica (Ultrassom, Q-Sonica). O processo foi realizado em modo direto, através de imersão da ponta de Ti (Titânio) 19 mm. Utilizou-se banho de gelo, com intuito de evitar o aumento da temperatura durante a dispersão. A potência acústica de 32 W (80 % de amplitude de energia liberada) durante 15 minutos no modo de pulsado (8 segundos de pulso e 2 segundos de intervalo consecutivamente).

As NPs foram caracterizadas por *Dynamic Light Scattering* (DLS) utilizando o equipamento (DLS, ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments) na concentração de 1 µg/mL de ZnONPs e 2 µg/mL de CeO₂NPs, diluído em em água Milli-Q, em cubeta de poliestireno, a 25 °C, depois de serem dispersas e utilizadas 24 horas após.

4.1.2 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta é considerado de importância extrema no estudo da estabilidade de suspensões coloidais, segundo o trabalho de Schaffazick e colaboradores (2003). Entende-se que são característicos de suspensões estáveis elevados valores de potencial zeta.

As medidas de potencial zeta foram realizadas no equipamento - ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments para verificar a estabilidade em solução das partículas dispersas. Para a medição do potencial zeta foi utilizado a concentração de 1 µg/mL de NPs de ZnO e 2 µg/mL de NPs de CeO₂, diluído em água Milli-Q, em cubeta de poliestireno, a 25 °C, em 24 h após depois de serem dispersas e em meio de cultura DMEM LOW, com 25 µL na NPs de CeO₂ e 35µL na NPs de ZnO de Albumina Sérica (BSA).

4.1.3 TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X DISPERSIVOS DE ENERGIA (EDS)

Com a finalidade de obter a composição elementar das NPs, foram feitas análises utilizando a técnica de espectroscopia de raio x por dispersão em energia (EDS) em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). As NPs foram depositadas em um suporte para MEV (stub) previamente recoberto fita dupla face de carbono. A amostra foi observada em um MEV Quanta FEG 450 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA) operando a 15kV e utilizando detector para emissão de raio X.

4.1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As NPs foram depositadas em grades de cobre revestidas com Formvar®. Em seguida as amostras foram secas overnight em temperatura ambiente e observadas no MET (Tecnai Spirit G2, FEI, USA) operando a 80 kV. As nanoemulsões serão processadas pelo mesmo protocolo, porém precedidas de fixação com tetróxido de ósmio 1% por 10 minutos, no escuro. O software ImageJ foi utilizado para estimar o diâmetro e o fator de forma das NPs a partir das imagens obtidas.

4.1.5 TÉCNICA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

As NPs de CeO₂ e ZnO foram montadas em suportes de alça de náilon (Hampton Research, EUA) individualmente e submetidas à análise de difração de pó em difratômetro SuperNova (Rigaku, EUA), à temperatura ambiente, operando a 40 W (50 kV e 0,8 mA), com radiação CuK α (1,5416 Å) e rotação phi-scan, com detecção na faixa de 20° – 90 ° (ângulos 2 θ). As imagens de difração foram processadas com CrysAlisPro® (Agilent).

4.2 IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO TG 491 da OECD

A implementação do ensaio TG 491 da OECD foi precedida pela etapa de demonstração de proficiência. Esta etapa é dada pela classificação de onze substâncias químicas já definidas, quanto à capacidade de gerar ou não irritação ocular. Descritas a seguir de acordo com sua classificação e *Registry Number Chemical Abstracts Service* (CAS RN). Categoria 1 - Cloreto de benzalcônio (CAS RN 8001-54-5), Vermelho ácido 92 (CASRN 18472-84-2), Triton X-100 (CAS RN 9002-93-1) e Hidróxido de sódio (CAS RN 1310-73-2), Sem Categoria - Acetato de 2-etoxietilo (CAS RN 111-15-9), Dodecano (CAS RN 112-40-3), Sulfato de n,n-dimetilguanidina (CAS RN 598-65-2) e Metil isobutil cetona (CAS RN

108-10-1) e Sem previsão - Ciclopentanol (CAS RN 96-41-3), o I-Octanol (CAS RN 111-87-5) e Butirolactona(CAS RN 96-48-0).

4.2.1 MODELO BIOLÓGICO

Para realização do método STE foi utilizado como modelo biológico a linhagem celular SIRC. As células foram cultivadas com o meio *Essencial Mínimo de Eagle* (MEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), acrescido de 2 mM de L-glutamina, 50 UI/mL de penicilina e 50 mg/mL de Estreptomicina. O cultivo foi realizado em garrafas de cultura estéreis. Após atingir 80% de semiconfluência, as células foram tripsinizadas e mantidas na densidade de $2,0 \times 10^4$ células/cm², em estufa de cultivo a 37 °C, em 95% atm com 5% de CO₂.

As células foram propagadas no mínimo 2 passagens antes de serem utilizadas nos experimentos e a permanência destas em cultura não ultrapassando 25 passagens após o descongelamento, tal como descrito no Guia 491 da OECD. Ao menos 3 lotes de 10 criotubos contendo de $1-2 \times 10^6$ células foram criopreservados para constituir os lotes de trabalho e o *masterbank*. Tais lotes foram testados quanto a presença de bactérias e fungos seguindo a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019), e de micoplasmas, por PCR e bioluminescência (FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V *et al.*, 2018).

4.2.2 PLAQUEAMENTO

O plaqueamento foi realizado em placas para cultivo celular de 96 poços fundo chato, na densidade de $6,0 \times 10^3$ células/poço, com 200 µL de meio de cultura em cada poço. As placas ficaram incubadas por quatro dias a 37 °C, e 5% de CO₂.

4.2.3 EXPOSIÇÃO

Após 4 dias de incubação as células atingiram confluência superior a 80%, o meio de cultura foi descartado e as células foram expostas aos controles, a saber, controle do meio (CM), controle do solvente (solução salina (CSS) ou óleo mineral (CSOM), a depender da substância) e controle positivo (CP) (SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*), na concentração de 0,01% solubilizado em solução salina), e as distintas concentrações das substâncias teste. Todas as exposições foram realizadas em triplicata.

As 11 substâncias químicas de referência foram diluídas nas concentrações de 5% (P/V) e 0,05 % e expostas às células em triplicata por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após esta etapa, as células na placa foram lavadas duas vezes com 200 µL/poço de D-PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) para posterior exposição ao MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*).

4.2.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente pelo ensaio de MTT. Após as lavagens, foi adicionada às placas 200 µL de MTT, (0,5 mg de MTT/mL) por poço e foi incubada, por duas horas em estufa de cultivo a 37 °C, e 5% de CO₂. Após este tempo, - em que as células vivas convertem o corante vital MTT em azul de formazana - o composto MTT/Formazan é extraído pela adição de 200 µL/poço da solução de ácido clorídrico e 0,04 N-isopropanol por 60 minutos e mantido em agitação à 100 rpm, em temperatura ambiente e sob proteção da luz. A presença de formazana foi mensurada a 570 nm em espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA).

A absorbância corrigida pelo branco de cada grupo foi comparada com o controle do solvente (viabilidade relativa) e utilizada para estimar o potencial de risco para os olhos, considerando o controle negativo como 100% da viabilidade celular.

4.2.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A leitura da Densidade Óptica (DO) das substâncias químicas teste foi utilizada para calcular a viabilidade celular em relação ao controle do solvente em 100%. A viabilidade celular relativa (%) foi obtida após a subtração da DO do branco seguido da divisão da DO do controle do solvente, seja ele CSS ou CSOM, a depender da substância.

Da mesma forma, a viabilidade celular relativa (%) de cada solvente de controle (CSS e CSOM) foi obtida após a divisão da DO de cada Controle do Solvente pela DO do CM e subtração a DO do branco de ambos os valores.

Foi realizada a média aritmética do ensaio contendo três poços replicados (n=3) para definir a viabilidade celular relativa.

A substância química de teste é classificada pelo *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (UN GHS) como Categoria 1, quando a viabilidade

reativa é $\leq 70\%$ nas duas concentrações (5% e 0,05%). A substância química é classificada como Sem Categoria (UN GHS), se as concentrações de 5 % e 0,05 % apresentarem viabilidade relativa $\geq 70\%$. Para resultados divergentes nas duas concentrações, as substâncias são classificadas como Sem Previsão, apresentando viabilidade relativa $\leq 70\%$ e $> 70\%$, nas concentrações de 5% e 0,05%, respectivamente.

Tabela 1: Modelo de previsão do método de teste STE.

Viabilidade		Classificação UN GHS
5 %	0,05 %	
$>70\%$	$>70\%$	Sem Categoria
$\leq 70\%$	$>70\%$	Sem Previsão
$\leq 70\%$	$\leq 70\%$	Categoria 1

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NPs PELA TG 491 DA OECD

O plaqueamento foi realizado em placas para cultivo celular de 96 poços fundo chato, na densidade de $6,0 \times 10^3$ células/poço, com 200 μL de meio de cultura em cada poço. As placas ficaram incubadas por quatro dias a 37°C , e 5% de CO_2 .

Após 4 dias de incubação as células atingiram confluência superior a 80 %, o meio de cultura foi descartado e as células foram expostas aos controles, a saber, controle do meio (CM), controle do solvente solução salina (CSS) ou óleo mineral (CSOM), a depender da substância) e controle positivo (CP) (SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*), na concentração de 0,01% solubilizado em solução salina), e as NPs de CeO_2 e ZnO diluídas em meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em temperatura ambiente, agitadas por 1 minuto.

Foi realizado DLS, a 25°C usando analisador de tamanho e diluição de partículas antes da sua utilização no ensaio. As NPs foram adicionadas às células em diferentes concentrações (1, 12, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$). As células foram avaliadas após exposição em 5 minutos e 24 horas. Após estes tempos, avaliamos a viabilidade celular por MTT, conforme descrito em 4.2.4.

4.4 TÉCNICA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA

Para a avaliação da impedância elétrica, utilizamos o analisador de células em tempo real (RTCA - Acea Bioscience) a fim de monitorar a proliferação celular em tempo real.

Foram utilizados 50 µl meio de cultura sem células para a calibração do sistema. O plaqueamento de $6,0 \times 10^4$ células/poço ocorrerá em placas para cultivo celular de 96 poços do tipo E-Plate View xCELLigence RTCA SP que contém microeletrodos de ouro no fundo dos poços, com 150 µL de meio de cultura em cada poço. Após 30 minutos as células foram colocadas na estação RTCA em uma incubadora e mantidas por 24 horas, atingindo 80% de confluência antes da exposição. Após esse período foram expostas ao controle do meio (CM), controle colorimétrico (CC) com apenas NPs na concentração de 400 µg/mL, controle positivo (CP) (SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*), na concentração de 0,01 % solubilizado em solução salina) e as NPs que foram previamente diluídas em temperatura ambiente, agitada por 1 minuto e em diferentes concentrações. Todas as exposições foram realizadas em triplicata e em um ensaio.

A placa E-plate retornou à estação RTCA por mais 48 horas a 37°C, e 5% de CO₂. Os dados foram obtidos automaticamente, a cada 1 hora, e processados por um programa instalado em computador acoplado ao equipamento. A impedância foi calculada pelo índice celular (IC) = $(Z_i - Z_0) [Ohm] / 15 [Ohm]$, onde Z₀ é a resistência do branco (meio de cultura sem células) e Z_i é a resistência em um ponto de tempo individual, fornecida pela presença de células aderidas.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CeO₂ e ZnO

5.1.1 DISPERSÃO DE LUZ DINÂMICA (DLS)

As NPs de CeO₂ e ZnO foram analisadas por meio da técnica de DLS e calculou-se a partir do movimento browniano o diâmetro hidrodinâmico (Figura 7). O índice de polidispersão (Pdl), também foi calculado. Em relação ao tamanho médio das NPs, podemos observar a diminuição do seu tamanho após a dispersão em relação as que não foram dispersas, também vale ressaltar a relevância em esperar 24 horas após a dispersão para retirar apenas as NPs mais dispersas que ficam na parte superior, que se separaram das aglomeradas decantando para o inferior do recipiente.

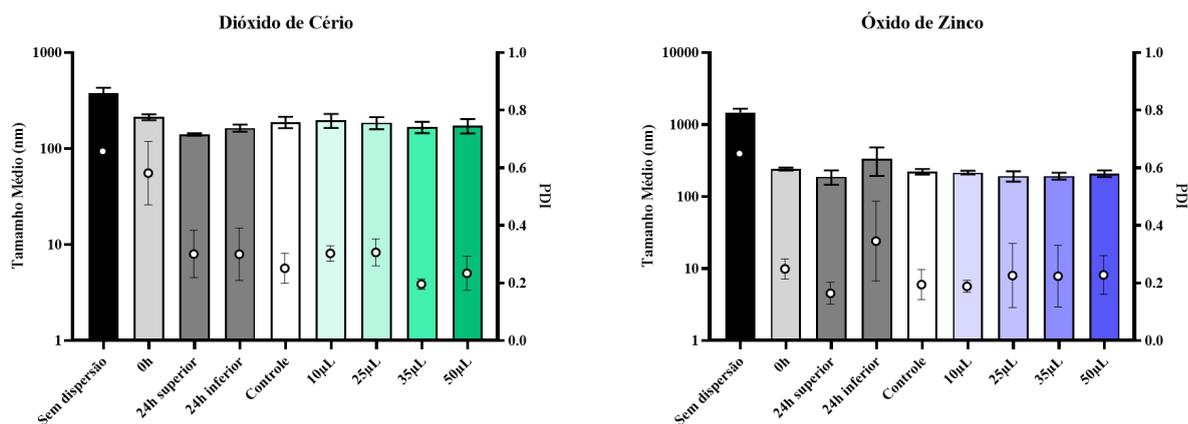


Figura 7: O tamanho médio e o índice de polidispersão (PDI) de NPs CeO₂ e ZnO foram avaliados por espalhamento de luz dinâmica (DLS). A) ZnO NPs têm um tamanho médio (em água) de 241,20 ± 11,49 nm. Após 24h de estabilização, teve um tamanho médio na água de 188,90 ± 42,68 nm. B) NPs CeO₂ têm um tamanho médio (em água) de 212,29 ± 15,38. Após 24h de estabilização, apresentou tamanho médio na água de 140,02 ± 4,26 nm. O tamanho médio das NPs após contato com o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glicose (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) e estabilizado com albumina sérica bovina (BSA) específica para as células deste estudo foi avaliada.

5.1.2 POTENCIAL ZETA

As NPs de CeO₂ e ZnO foram analisadas por meio da técnica de potencial zeta e as medidas foram realizadas para verificar a estabilidade em solução, das partículas dispersas em água e em meio de cultura (Figura 8). As NPs são consideradas estáveis quando o potencial zeta se demonstra acima 25 mV (MIRHOSSEINI et al., 2008), com base nessa premissa as NPs de CeO₂ e ZnO em água são consideradas estável. Quando as NPs entraram em contato com o meio de cultura rico em proteínas, os quais são aniônicos, tornaram a carga superficial negativa.

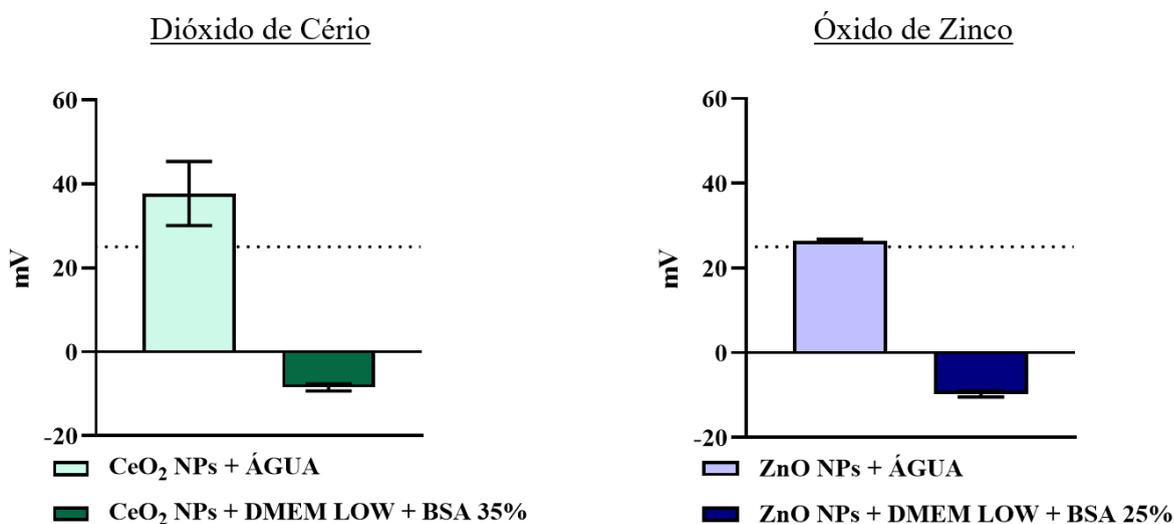


Figura 8: Em relação ao potencial Zeta, as NPs demonstram estabilidade em água. Houve diferença na carga superficial (mV) das NPs após o contato com o meio de cultura, provavelmente devido à formação da corona proteica. A linha pontilhada nos gráficos equivale 25 mV.

5.1.3 TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X DISPERSIVOS DE ENERGIA (EDS)

A análise EDS é uma das técnicas mais versáteis existentes para examinar a composição elementar de nanopartículas (COSTA, 2016). A técnica de EDS foi empregada objetivando-se a análise elementar da composição das NPs (Figura 9). As análises de EDS detectaram um pico referente ao elemento Cério e Zinco nas amostras A e B respectivamente. Foram também encontrados no espectro os elementos Carbono (C) e Oxigênio (O).

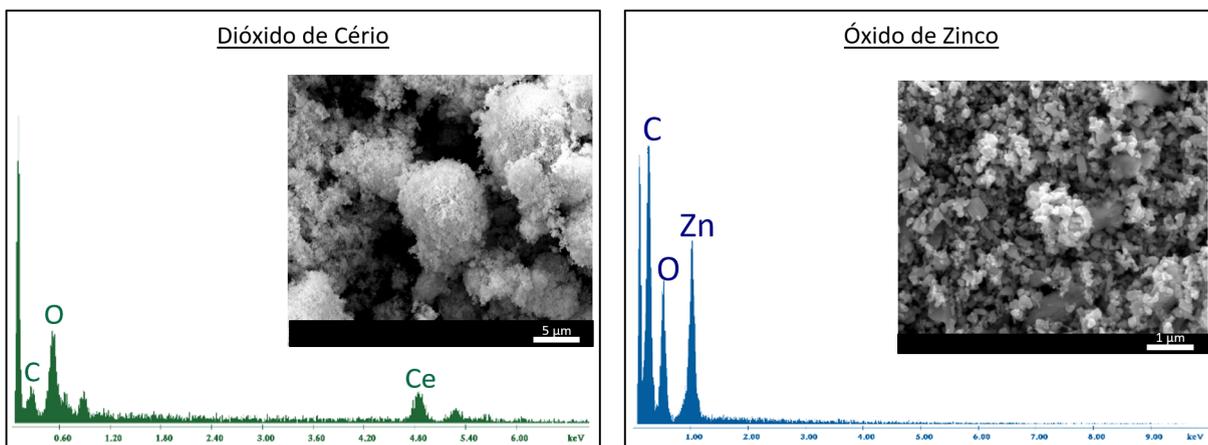


Figura 9: Técnica de espectroscopia de raios X por dispersão de energia no microscópio eletrônico de varredura (MEV) de NPs de CeO_2 e ZnO . Imagens obtida por MEV por um sinal de elétrons secundários de NPs de CeO_2 e ZnO determinando a composição elementar e indicando alta aglomeração de nanopartículas respectivamente.

5.1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para análise do fator de forma determinando a morfologia das NPs de CeO_2 e ZnO (Figura 10). As imagens de microscopia foram tratadas com o auxílio do software ImageJ. A análise qualitativa de MET indica que as partículas primárias de CeO_2 demonstram ser poliédricas com morfologia irregular e uma distribuição de tamanho não homogênea, variando de menos de 10 nm a bem mais de 100 nm. Já as NPs de ZnO observou-se que os cristais primários eram poliédricos com morfologia bastante variável. Dois tipos principais de morfologia podem ser distinguidos: -1. partículas com proporção próxima de 1 (normalmente tamanho de 20 a 250 nm e muito poucas partículas de tamanho de aproximadamente 400 nm) e morfologia prevalentemente hexagonal. 2. partículas com proporção de aspecto 2 a 7,5 (50 – 350 nm) com morfologias cúbica e tetragonal.

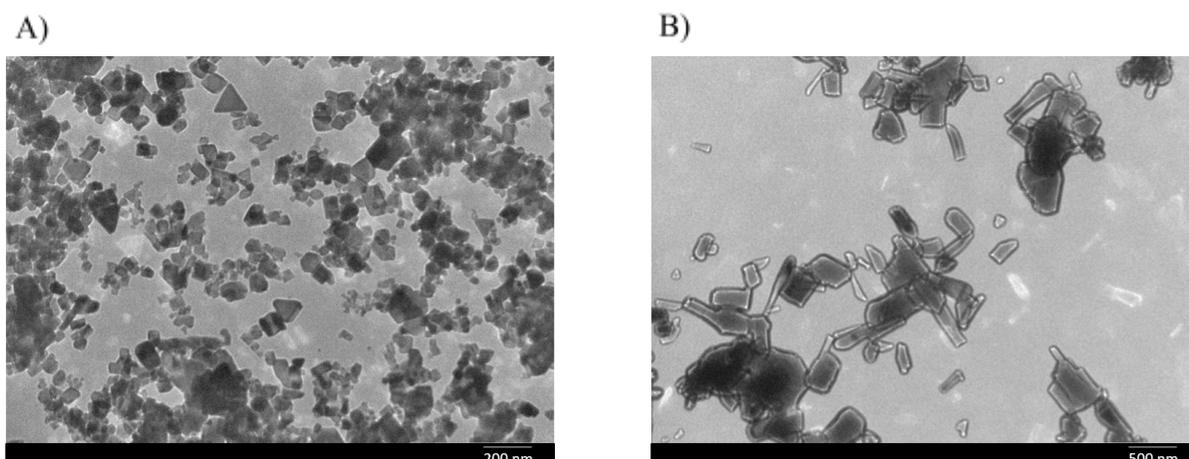


Figura 10: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das NPs de CeO₂ e ZnO para análise do fator de forma. A) As NPs de CeO₂ possuem morfologia poliédricas e irregular. B) As NPs de ZnO possuem morfologia prevalente exagonal.

5.1.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A técnica de Difração de Raios X (DRX) foi usada para a determinação e confirmação da natureza e pureza das NPs de CeO₂ e ZnO, por meio da deposição da amostra sólida (pó das NPs). Os picos corresponderam ao padrão das NPs de CeO₂ e ZnO devido a sua natureza cristalina (Figura 11).

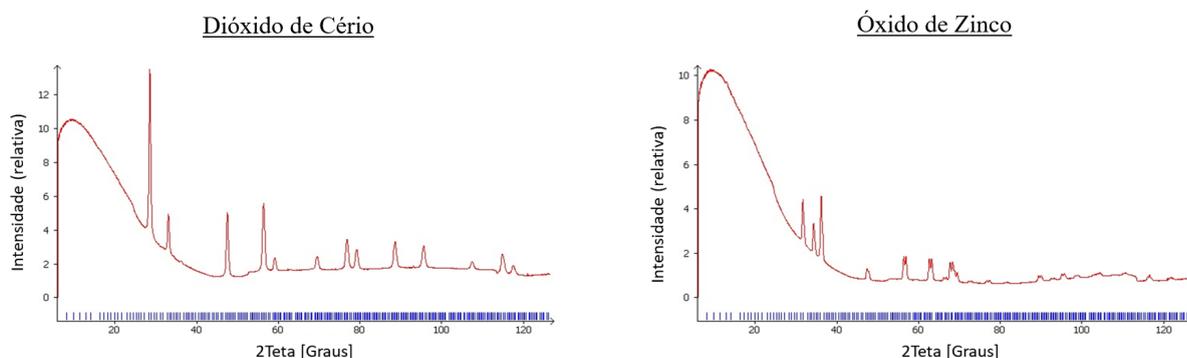


Figura 11: Técnica de Difração de Raios X (DRX) para determinação da natureza das NPs em pó. Os picos formados no DRX demonstram a natureza cristalina das NPs de CeO₂ e ZnO.

5.2 TESTE DE PROFICIÊNCIA DO ENSAIO 491 DA OECD

5.2.1 SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO CATEGORIA 1

A viabilidade relativa das substâncias analisadas foi obtida por meio de leitura fotométrica em 570nm. Para cada substância teste foram realizados em um ensaio em triplicata (n=3) e a média aritmética final foi calculada a partir destes. Os dados estatísticos

foram avaliados para a classificação das substâncias em Categoria 1, Sem Categoria e Sem Previsão, de acordo com o UN GHS (Figura 12).

As substâncias classificadas como Categoria 1 foram Cloreto de benzalcônio, Vermelho ácido 92, Triton X-100 e Hidróxido de sódio. As viabilidades relativas das substâncias mencionadas para as duas concentrações (5% e 0,05%) foram $\leq 70\%$ (Figura 11), em conformidade com os critérios de aceitação (ANEXO 1).

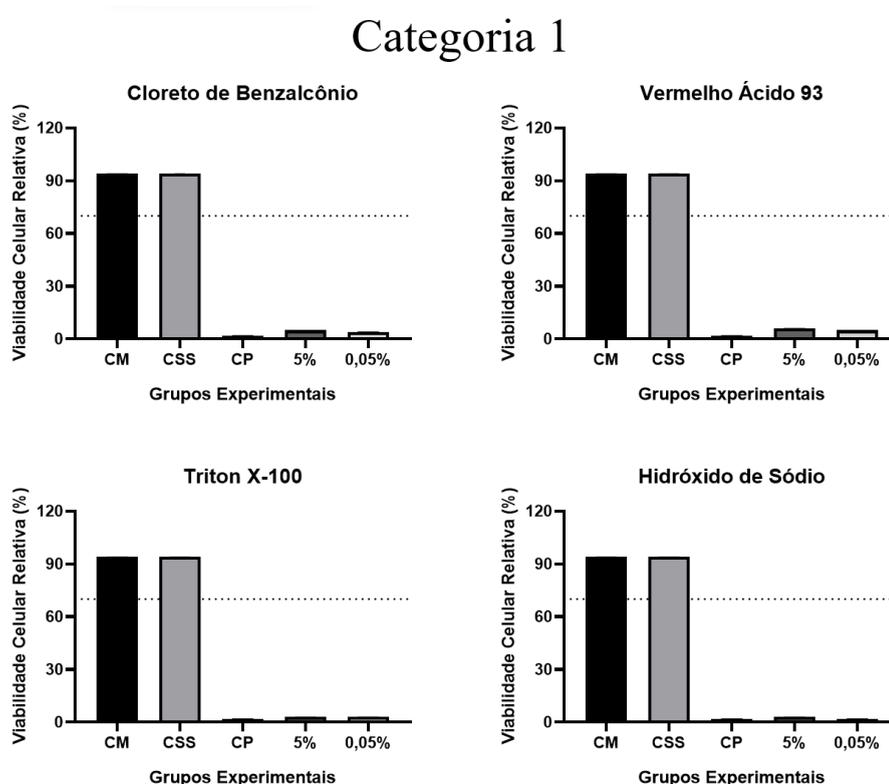


Figura 12: Viabilidade celular relativa (n=3) das substâncias classificadas como categoria 1 (Cloreto de Benzalcônio, Vermelho Ácido 92, Triton X-100 e Hidróxido de Sódio) de acordo com UN GHS. Controle do Meio (CM), Controle do Solvente Salino (CSS), Controle positivo (CP), maior concentração testada (5 %) e menor concentração (0,05 %). A linha pontilhada nos gráficos equivale à viabilidade relativa de 70 %. Categoria 1 - Viabilidade Celular relativa $\leq 70\%$ para ambas as concentrações testadas.

5.2.2 SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO SEM CATEGORIA

As substâncias classificadas como Sem Categoria foram Acetato de 2-etoxietilo, Dodecano, Sulfato de n,n-dimetilguanidina e Metil isobutil cetona. As viabilidades relativas das substâncias mencionadas para as duas concentrações (5% e 0,05%) foram $\geq 70\%$ (Figura 13), em conformidade com os critérios de aceitação (ANEXO 1).

Sem Categoria

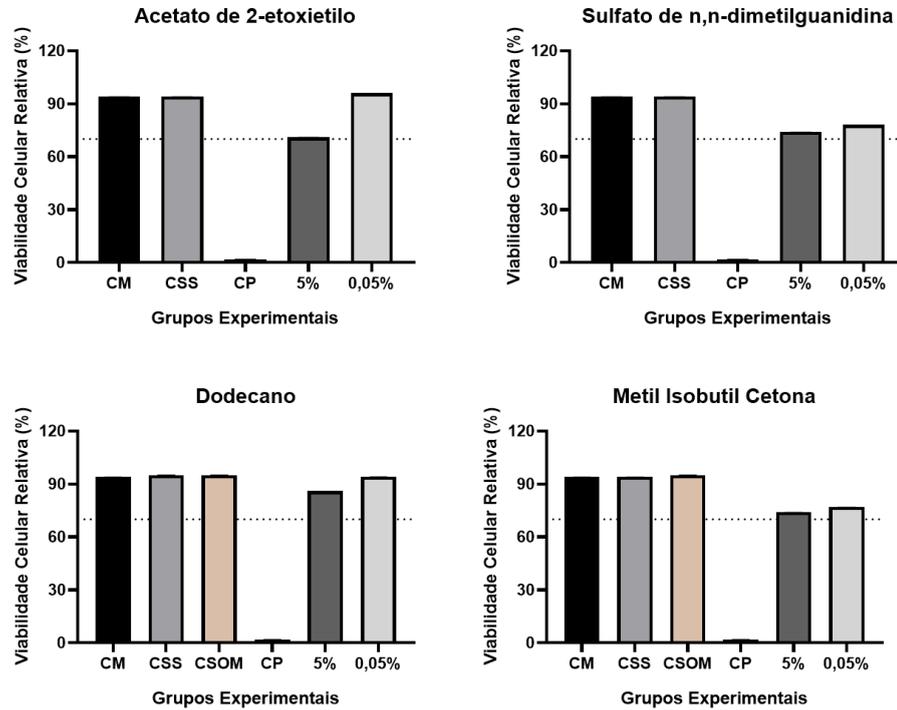


Figura 13: Viabilidade celular relativa (n=3) das substâncias classificadas como Sem categoria (Acetato de 2-etoxietilo, Sulfato de n,n-dimetilguanidina, Dodecano e Metil isobutil cetona) de acordo com UN GHS. Controle do Meio (CM), Controle do Solvente Salino (CSS), Controle do Solvente de Óleo Mineral (CSOM), Controle positivo (CP), maior concentração testada (5 %) e menor concentração (0,05 %). A linha pontilhada nos gráficos equivale à viabilidade relativa de 70 %. Sem Categoria - Viabilidade Celular relativa > 70 % para ambas as concentrações testadas.

5.2.3 SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO SEM PREVISÃO

As substâncias classificadas como Sem Previsão foram o Ciclopentanol e o I Octanol. As viabilidades relativas das substâncias mencionadas para as duas concentrações (5% e 0,05 %) foram $\leq 70\%$ e $> 70\%$, respectivamente (Figura 14), em conformidade com os critérios de aceitação (ANEXO 1).

Sem Previsão

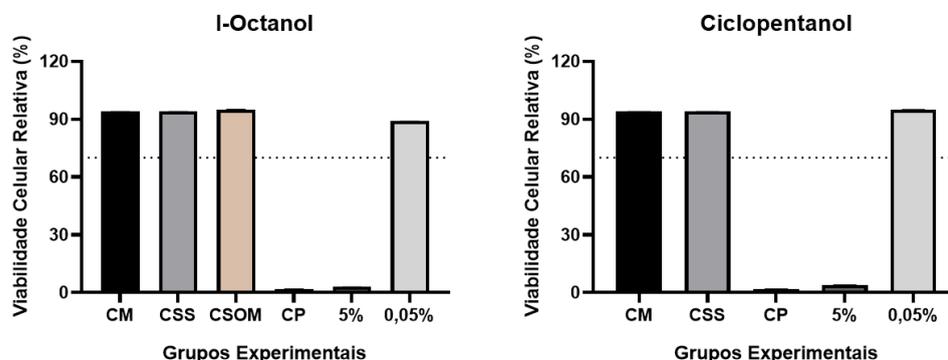


Figura 14: Viabilidade celular relativa (n=3) das substâncias classificadas como Sem Previsão (Ciclopentanol e o I-Octanol) de acordo com UN GHS. Controle do Meio (CM), Controle do Solvente Salino (CSS), Controle do Solvente de Óleo Mineral (CSOM), Controle positivo (CP), maior concentração testada (5 %) e menor concentração (0,05 %). A linha pontilhada nos gráficos equivale à viabilidade relativa de 70 %. Sem Previsão - Viabilidade celular relativa (5 % e 0,05 %) ≤ 70 % e >70 %, respectivamente.

5.3 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA TG 491 PARA AS NPs DE ZnO e CeO₂

5.3.1 AVALIAÇÃO DAS NPs DE ZnO e CeO₂ EM 5 MINUTOS DE EXPOSIÇÃO

A viabilidade celular relativa das NPs de CeO₂ e ZnO foi obtida por meio de leitura fotométrica em 570 nm. Para cada NP foi realizado em um ensaio em triplicata para cada concentração (n=3) com o tempo de exposição de 5 minutos e a média aritmética final foi calculada a partir destes. Nota-se que em todas as concentrações de NPs com o tempo de exposição de 5 minutos, não apresentou viabilidade celular inferior a 70%, sugerindo que as NPs de CeO₂ e ZnO não apresentam citotoxicidade (Figura 15). O controle colorimétrico (sem células) apresentou viabilidade celular superior a 80%.

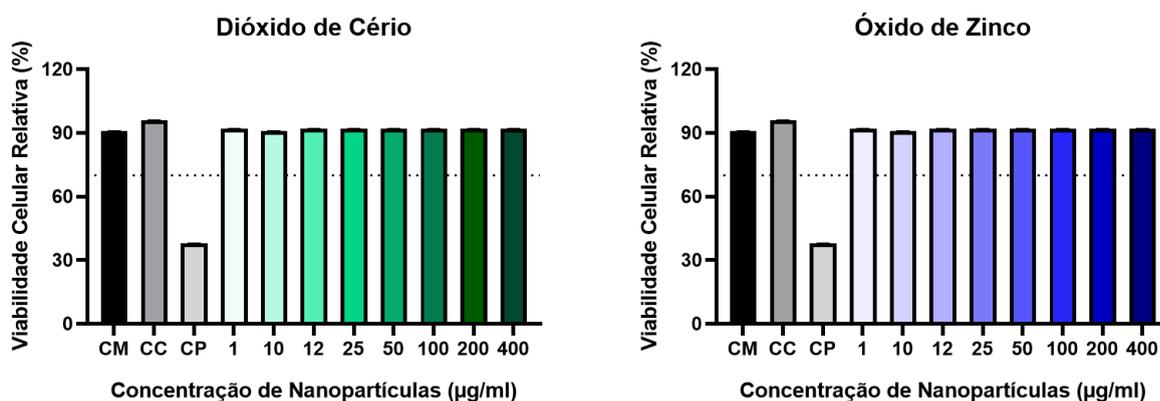


Figura 15: Viabilidade celular relativa (n=3) das NPs de CeO₂ e ZnO nas concentrações de 1, 12, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL. Controle do Meio (CM), Controle Colorimétrico (CC), Controle positivo (CP). A linha pontilhada nos gráficos equivale à viabilidade relativa de 70 %.

5.3.2 AVALIAÇÃO DAS NPs DE ZnO e CeO₂ EM 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO

A viabilidade celular relativa das NPs de CeO₂ e ZnO foi obtida por meio de leitura fotométrica em 570 nm (Figura 16). Para cada NP foi realizado um ensaio em triplicata para cada concentração (n=3) com o tempo de exposição de 24 horas e a média aritmética final foi calculada a partir destes. Nota-se que em todas as concentrações de NPs com o tempo de exposição de 24 horas, não apresentou viabilidade celular inferior a 70%, sugerindo que as NPs de CeO₂ e ZnO não apresentam citotoxicidade. O controle colorimétrico (sem células) apresentou viabilidade celular superior a 80%.

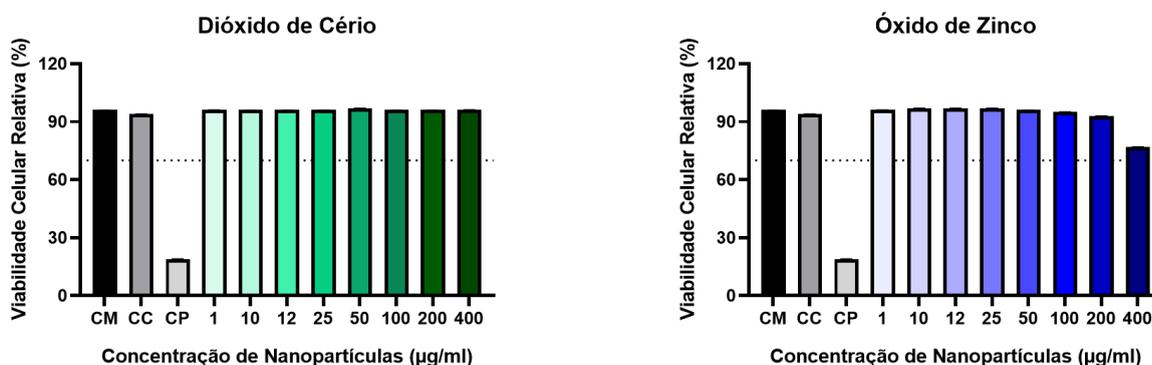


Figura 16: Viabilidade celular relativa (n=3) das NPs de CeO₂ e ZnO nas concentrações de 1, 12, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL. Controle do Meio (CM), Controle Colorimétrico (CC), Controle positivo (CP). A linha pontilhada nos gráficos equivale à viabilidade relativa de 70 %.

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS NPs DE CeO₂ e ZnO UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA

O índice celular das NPs de CeO₂ e ZnO foi obtido a cada hora por impedância elétrica em tempo real. Para cada NP foi realizado em um ensaio em triplicata para cada concentração (n=3) com o tempo de exposição de 48 horas e a média aritmética final foi calculada a partir destes (Figura 17). O controle positivo foi efetivo em reduzir o índice celular (IC) a nível da linha de base indicando o descolamento das células no grupo ZnO, cuja toxicidade foi notável a partir de 50 µg/mL, causando a parada na proliferação celular. Destaque-se que o CeO₂ na mesma concentração, promoveu um aumento relativo de cerca de duas vezes em relação ao grupo controle, causando um aumento da CI dose dependente.

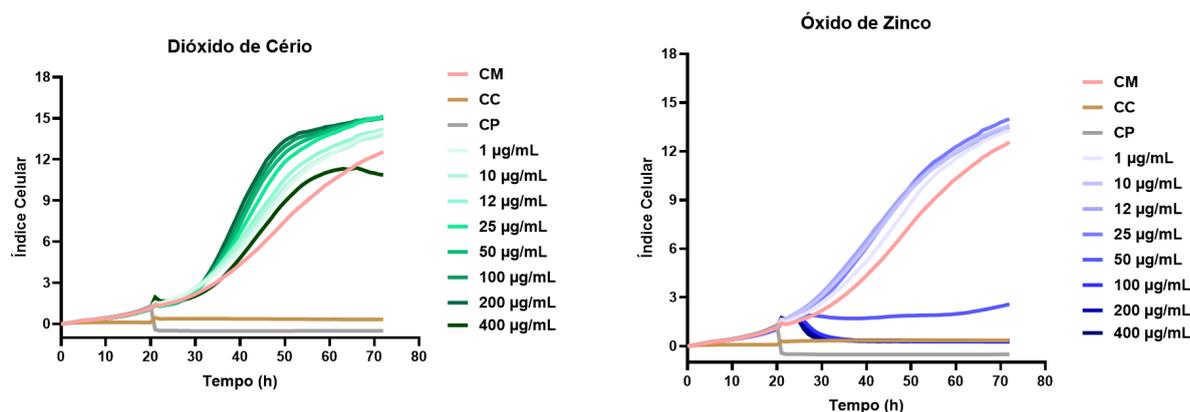


Figura 17: Índice celular (n=3) das NPs de CeO₂ e ZnO nas concentrações de 1, 12, 25, 50, 100, 200, 400 µg. Controle do Meio (CM), Controle Colorimétrico (CC), Controle positivo (CP).

6 DISCUSSÃO

No cenário brasileiro, marcado pela adoção de resoluções que fomentam o uso de metodologias alternativas para minimizar o emprego de animais em pesquisa e desenvolvimento, este estudo busca contribuir significativamente com a implementação do método STE. Esta abordagem é particularmente relevante para pesquisadores e indústrias no Brasil, visando avaliar o potencial de corrosão e irritação ocular de substâncias químicas.

O método STE se baseia na análise da citotoxicidade, uma técnica já consolidada na avaliação de irritação ocular. Esta metodologia correlaciona a morte celular *in vitro* com danos oculares causados pelo contato com agentes irritantes e corrosivos (MAURER J. K. et al., 2002). O STE apresenta vantagens em comparação a outros métodos alternativos reconhecidos pela OECD (OECD, 2018), sendo aplicável na previsão de irritação ocular causada por uma gama de substâncias, incluindo álcoois, ácidos, aminas alcalinas e produtos químicos insolúveis em água, como tolueno e hexanol (TAKAHASHI Y., 2008). Além disso, destaca-se por ser uma metodologia mais simples, econômica e rápida, pois o tempo de exposição à substância testada é de apenas 5 minutos, contrastando com os métodos convencionais de citotoxicidade que exigem exposições de 24 a 92 horas (TAKAHASHI Y. et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

No contexto da Nanotoxicologia e das propriedades únicas dos NM, a importância do STE é ainda mais ressaltada. Os NM, devido às suas características específicas em escala nanométrica, podem apresentar comportamentos diferenciados em termos de toxicidade quando comparados aos seus equivalentes em escala maior. Portanto, testes *in vitro* como o

STE tornam-se ferramentas essenciais para avaliar a segurança dessas substâncias, minimizando riscos associados à exposição a produtos perigosos, bem como a outros produtos de consumo e seus constituintes. Isso permite que os produtos sejam disponibilizados aos consumidores com informações mais claras sobre sua segurança e possíveis riscos (WILSON S. L. et al., 2015).

Em resumo, apesar da existência de uma variedade de métodos experimentais alternativos, o STE se destaca pela sua alta precisão e sensibilidade. Representa uma metodologia alternativa promissora para a redução do uso de animais em experimentos. Assim, o estabelecimento deste método no LABIO (Laboratório de Biologia) reforça a prestação de um serviço de excelência, especialmente voltado para o mercado brasileiro.

Para efetivar o ensaio de proficiência e estabelecer o método STE, é essencial obter resultados que estejam em conformidade com os critérios de aceitação estabelecidos. Isso inclui a realização de três ensaios independentes (n=9) e a utilização de todas as 11 substâncias classificadas conforme o UN GHS específico para esta metodologia. No entanto, desafios e intercorrências são inevitáveis, como atrasos na chegada das substâncias químicas necessárias para o teste de proficiência, a falta de entrega de uma substância chave (butirolactona), atrasos devido à pandemia de SARS-CoV-2 e problemas internos no laboratório. Essas questões impediram a realização dos três ensaios independentes para o ensaio de proficiência do método (Figuras 12, 13 e 14), postergando a implementação do método OECD TG 491 para o doutorado em biotecnologia do INMETRO.

Além disso, ao utilizar o ensaio STE, que emprega a técnica de MTT, enfrentamos o desafio de interferência colorimétrica. Substâncias que reduzem diretamente o MTT podem causar subestimação da citotoxicidade, pois redutores do MTT geram o corante formazan sem a necessidade de redutase intracelular (ALÉPÉE N. et al., 2015). Compostos coloridos também podem interferir na absorção do corante formazan MTT, resultando em subestimação da citotoxicidade (ALÉPÉE N. et al., 2015). Um exemplo é a doxorubicina (DOXO), um agente quimioterápico e ferramenta comum em pesquisas de biologia celular, cuja presença interfere na medição da atividade metabólica (LUIS C. et al., 2019). Ainda não determinou se os resultados dos testes STE com redutores de MTT e substâncias fortemente coloridas refletem essa interferência na absorbância (ABO T. et al., 2023).

Apesar de o MTT ser um dos métodos mais utilizados para determinar proliferação, viabilidade, toxicidade e atividade metabólica, cresce o entendimento de suas limitações em termos de complexidade e sensibilidade. Reconhecemos que as reações com a natureza colorimétrica dos compostos em cada configuração experimental específica devem ser consideradas (RISS T., 2014). Portanto, ao aplicar o método STE com a técnica de MTT, especialmente na avaliação da citotoxicidade de NPs, pode haver interferência colorimétrica significativa.

Na avaliação da citotoxicidade ocular das NPs de CeO₂ e ZnO, observou-se, através do controle colorimétrico do ensaio de MTT (sem células, apenas NPs), uma DO muito próxima do controle do meio (com células) para ambos os tempos de exposição, 5 minutos e 48 horas (Figuras 15 e 16). Este resultado contrasta com o observado no ensaio de impedância elétrica, onde o controle colorimétrico apresentou índice celular próximo ao controle positivo, indicativo de morte celular, revelando uma limitação da técnica MTT ao utilizar NPs (Figura 17). Uma busca ativa da literatura não identificou, até esse momento, estudos que tenham avaliado a interferência direta de nanopartículas de CeO₂ e ZnO no ensaio de MTT.

Além disso, em concentrações de NPs de ZnO acima de 50 µg/mL, o ensaio de impedância elétrica mostrou uma redução significativa no índice celular, aproximando-se dos controles positivo e colorimétrico. Contrariamente, no ensaio de MTT, em nenhuma condição a DO indicou menos de 70% de viabilidade celular, sugerindo falsamente que a substância não é tóxica nessas concentrações mais elevadas, similar ao observado para os nanotubos de parede simples (KONG et al., 2011).

Os ensaios toxicológicos enfrentam desafios de lacunas e erros em protocolos que podem levar a resultados não confiáveis e irreprodutíveis, uma preocupação crescente para as agências reguladoras de saúde e institutos nacionais de metrologia. A falta de reprodutibilidade na pesquisa científica impacta negativamente a saúde, eficiência da produção, progresso científico e credibilidade perante a sociedade, além de causar desperdício de recursos (NIH, 2015; FREEDMAN et al., 2015; COLLINS e TABAK, 2014).

Com o aumento do uso de NPs em produtos, seu potencial de toxicidade ocular precisa ser rigorosamente estudado. No entanto, algumas NPs podem alterar as propriedades ópticas em ensaios colorimétricos, gerando resultados enganosos (ABO T. et al., 2023). A impedância elétrica, um ensaio não colorimétrico que não depende de medições ópticas, fornece

informações cinéticas detalhadas de forma não invasiva e com alta resolução temporal (ISO/TS 21633:2021).

Dada a controvérsia existente sobre a segurança dos nanomateriais, a utilização de métodos normatizados e validados, como a ABNT-NBR-ISO 17025:2017, BPL e ISO/TS 21633:2021, é uma estratégia relevante. O uso de métodos alternativos ao uso de animais oferece maior relevância humana e consideração ética. Especificamente para as NPs de CeO₂ e ZnO, emergentes no mercado, uma avaliação cuidadosa pode prevenir riscos associados ao seu manuseio e otimizar sua aplicação biomédica.

Portanto, a técnica de impedância elétrica poderá ser avaliada como um método alternativo para estudar a viabilidade e toxicidade de NPs *in vitro* sem interferência, visando validar sua adequação para a análise da toxicidade ocular utilizando células SIRC, conforme o Doc-Cgcre008.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados e discussões apresentados neste estudo, a conclusão pode ser sintetizada da seguinte forma:

Este estudo demonstrou que a técnica de impedância elétrica é uma ferramenta valiosa e eficaz para avaliar a toxicidade ocular de NPs de CeO₂ e ZnO, demonstrando o efeito positivo da CeO₂ na proliferação celular e a toxicidade intensa com 50 ug/ml de ZnO. Os resultados do ensaio de impedância elétrica, em comparação com os do ensaio colorimétrico de MTT, revelaram uma limitação significativa deste último na presença de NPs, especialmente em altas concentrações. Enquanto o MTT falhou em detectar a toxicidade em concentrações mais elevadas, o ensaio de impedância elétrica forneceu uma avaliação mais precisa e confiável da citotoxicidade, alinhando-se melhor com os controles positivos e fornecendo um indicativo mais realista da morte celular.

Além disso, o estudo ressaltou a importância de utilizar métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa toxicológica, especialmente no contexto da crescente utilização de NPs em diversos produtos. A implementação de técnicas como a impedância elétrica não apenas se alinha com os princípios éticos dos 3R, mas também oferece dados com maior relevância humana e menos variabilidade, comparado a métodos tradicionais baseados em testes animais.

A pesquisa também enfatizou a necessidade de adotar protocolos normatizados e validados no contexto da nanotoxicologia, para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. A adoção de padrões como a ABNT-NBR-ISO 17025:2017 e a ISO/TS 21633:2021 é crucial para o avanço do campo e para a segurança no desenvolvimento de novos produtos contendo NPs.

Em conclusão, este estudo reforça a viabilidade e a importância da técnica de impedância elétrica como um método alternativo eficiente e confiável para a avaliação da toxicidade ocular de NPs. Com a continuidade da pesquisa e validação desta técnica, espera-se uma contribuição significativa para o campo da toxicologia, melhorando a segurança dos produtos de consumo e avançando na pesquisa científica de forma ética e responsável.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO T, DEGUCHI Y, YUKI T, TAKAHASHI Y, MIYAZAWA M, SAKAGUCHI H. Evaluation of MTT reducers and strongly colored substances in the Short Time Exposure test method for assessing eye irritation potential. *J Toxicol Sci.* 2023;48(6):363-374. doi: 10.2131/jts.48.363. PMID: 37258241.

ADRIAENS E., et al., 2017. CON4EI: Development of testing strategies for hazard identification and labelling for serious eye damage and eye irritation of chemicals. **Toxicology In Vitro.**

ALÉPÉE, N., BARROSO, J., DE SMEDT, A., DE WEVER, B., HIBATALLAH, J., KLARIC, M., MEWES, KR, MILLET, M., PFANNENBECKER, U., TAILHARDAT, M., TEMPLIER, M. e MANAMEE, P. (2015): Uso de espectrofotometria HPLC/UPLC para detecção de formazan em métodos de teste baseados em tecido humano reconstruído (RhT) in vitro empregando o ensaio de redução de MTT para expandir sua aplicabilidade para fortemente produtos químicos de teste coloridos. **Toxicol. In Vitro**, 29, 741-761.

ALEXANDER, F. A., JR., CELESTIN, M., PRICE, D. T., NANJUNDAN, M. e BHANSALI, S. 2013. Design and validation of a multi-electrode bioimpedance system for enhancing spatial resolution of cellular impedance studies. **Analyst**, 138, 3728-34.

ANVISA (2019), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Pdf. Acesso em 17 de nov. 2022.

ANVISA (2023), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde de Base Nanotecnológica Guia nº 63/2023 – versão 1. Pdf. Acesso em 30 de nov. 2023.

BRITISH MUSEUM, 2022. The Lycurgus Cup. Disponível em: <https://www.britishmuseum.org/collection/object/H_1958-1202-1>. Acesso em 20 de set de 2022.

CASSEE FR, VAN BALEN EC, SINGH C, GREEN D, MUIJSER H, WEINSTIN J, DREHER K. Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive. **Crit Rev Toxicol**. 2011 Mar;41(3):213-29.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

COLLINS, Francisco S.; TABAK, Lawrence A. Política: NIH planeja aumentar a reprodutibilidade. **Nature**, v. 505, n. 7485, pág. 612-613, 2014.

CONCEA, 2014. Resolução normativa, n-17 de 03.07.2014. Sessão-I-Pag.9.pdf. Disponível em: <www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-17-de-03.07.2014-D.O.U.-de-04.07.2014-Secao-I-Pag.-51.pdf>. acesso em: 26 de ago de 2022.

CONCEA, 2014. Resolução normativa, n-18 de 24-09-2014. Sessão-I-Pag.9.pdf. Disponível em: <www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf>. Acesso em: 26 de ago de 2022.

CONCEA, 2016. Resolução Normativa, n-31 de 19.08.2016. Sessão-I-Pag.04.pdf. Disponível em:

<www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf>. Acesso em: 10 de set de 2012

DALBEN D, EMMEL JL, (2013) A Lei Arouca e os direitos dos animais utilizados em experimentos científicos. **Revista Eletrônica de Iniciação Científica**. 2013;4(4):280-91.

DRAIZE J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, O. H., (1944) Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.83, p.377-390, 1944.

ERBAYKENT-TEPEDELEN B., OZMEN B., VARISLI L., GONEN-KORKMAZ C., DEBELEC-BUTUNER, B, MUHAMMED SYED H., YILMAZER-CAKMAK O., KORKMAZ K.S. 2011. NKX3.1 contributes to S phase entry and regulates DNA damage response (DDR) in prostate cancer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**. 414:123-8.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food Bioprocess Technol**. 5:1447-1464, 2012.

FERREIRA, V.B. Nanotecnologia e sua importância no contexto brasileiro. In: E-science e políticas públicas para ciência, tecnologia e inovação no Brasil. Salvador: EDUFBA, 2018, pp. 97-106.

FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.; GOMES, B. C.; LEVE, F.; BOLDRINI, L. C. A importância do controle de qualidade de culturas utilizadas em ensaios biológicos e no desenvolvimento de pesquisas na área de saúde. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 6, n. 1, p. 96, 28 fev. 2018.

FREEDMAN, Leonard P.; COCKBURN, Iain M.; SIMCOE, Timothy S. A economia da reprodutibilidade na pesquisa pré-clínica. *Biologia PLoS*, v. 13, n. 6, pág. e1002165, 2015.

GIAEVER, I. & KEESE, C. R. 1991. Micromotion of mammalian cells measured electrically. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88, 7896-900.

GIAEVER, I. & KEESE, C. R. 1993. A morphological biosensor for mammalian cells. **Nature**, 366, 591-2.

GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 8, p. 1362-1395, ISSN 1521-3773. 2010.

GUADAGNINI, R., HALAMODA KENZAOU, B., WALKER, L., POJANA, G., MAGDOLENOVA, Z., BILANICOVA, D., SAUNDERS, M., JUILLERAT-JEANNERET, L., MARCOMINI, A., HUK, A., DUSINSKA, M., FJELLSBO, L. M., MARANO, F. & BOLAND, S. 2015. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. **Nanotoxicology**, 9 Suppl 1, 13-24.

HAMIDI, H., LILJA, J. and IVASKA, J. (2017). Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. **Bio-protocol** 7(24): e2646. DOI: 10.21769/BioProtoc.2646.

HAYASHI, K., MORI, T., ABO, T., KOIKE, M., TAKAHASHI, Y., SAKAGUCHI, H., NISHIYAMA, N. (2012) A tiered approach combining the short time exposure (STE) test and the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay for predicting eye irritation potential of chemicals. **J Toxicol Sci.** v.37, n.2, p.269-80, 2012.

HEI - Health Effects Institute, Research Report, 2001. Evaluation of Human Health Risk from Cerium added to Diesel Fuel.

HOFFMANN S., *et al.*, 2008. A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals *Toxicol.*

HONDROULIS, E., LIU, C. & LI, C. Z. 2010. Whole cell based electrical impedance sensing approach for a rapid nanotoxicity assay. **Nanotechnology**, 21, 315103.

JALILI-FIROOZINEZHAD, S., MIRANDA, C. C., & CABRAL, J. M. S. (2021). Modeling the Human Body on Microfluidic Chips. **Trends in Biotechnology**, 39(8), 838–852.

JEEVANANDAM J., BARHOUM A., CHAN, Y. S., DUFRESNE, A., & DANQUAH, M. K.; 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, 9(1), 1050-1074.

KE N., WANG X., XU X. & ABASSI, Y. A. 2011. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. **Methods Mol Biol**, 740, 33-43.

KIM, Y.R., LEE, S.E., KANG, I.C., NAM, K.I., CHOY, H.E., RHEE, J.H. 2013. A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium mediated mitochondrial dysfunction. *J Infect Dis.* 207(9), 1406-15.

KONG B, SEOG JH, GRAHAM LM, LEE SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine* (Lond). 2011 Jul;6(5):929-41. doi: 10.2217/nnm.11.77. PMID: 21793681; PMCID: PMC3196306.

LOTZ C. *et al.* Alternative Methods for the Replacement of Eye Irritation Testing. **ALTEX, Würzburg**, v. 33, n. 1, p. 55-67, 2016.

LUIS C, CASTAÑO-GUERRERO Y, SOARES R, SALES G, FERNANDES R. Avoiding the Interference of Doxorubicin with MTT Measurements on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Methods Protoc.** 2019 Apr 12;2(2):29. doi: 10.3390/mps2020029. PMID: 31164609; PMCID: PMC6632110.

MAURER, J. K.; PARKER, R. D.; JESTER, J. V. Extent of Initial Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Ohio, v. 36, n. 1, p. 106-117, 2002.

MCNAMEE P. *et al.* (2009). A tired approach to the use of alternative to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regul. Toxicol Pharmacol* v.54, p.197-209, 2009.

MEHRA N.K., CAI D, KUO L, HEIN T, PALAKURTHI S. 2016. Safety and toxicity of nanomaterials for ocular drug delivery applications. **Nanotoxicology.** 2016; 10: 836–860. doi: 10.3109 / 17435390.2016.1153165.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C.P.; HAMID, N.S.A.; YUSOF, S. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on zeta-potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: hysicochemical and Engineering Aspects**, v.315, n.1-3, p.47-56, 2008.

NARLA, S., LIM, H.W. Sunscreen: FDA regulation, and environmental and health impact. **Photochem Photobiol Sci** 19, 66–70 (2020).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, (2003). GUIDELINES FOR THE CARE AND USE OF MAMMALS IN NEUROSCIENCES AND BEHAVIORAL RESEARCHES. Washington DC. National Academy Press.

NIH (2015) – *National Institutes Health*. Rigor e reprodutibilidade. <https://www.nih.gov/research-training/rigor-reproducibility>. Acesso em 12 de fev de 2023.

OECD (2014) Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, Série sobre a segurança de nanomateriais manufaturados, número 6, Lista de nanomateriais manufaturados e lista de pontos finais para a fase um do programa de testes da OCDE, http://sectordialogues.org/sites/default/files/acoes/documentos/dialogos_setoriais_nanotecnologia_portugues.pdf (acessado em janeiro de 2022).

OECD (2015). Guideline for Testing of Chemicals N° 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/testguidelines>>. (Acesso em janeiro de 2022).

OECD (2017). Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), Series on Testing & Assessment No. 260. **Environment Directorate ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT**, Paris.

OECD (2018). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment N° 263. **ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development**, Paris.

OECD (2023) Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 106. **Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development**, Paris.

OOSTINGH, G. J., CASALS, E., ITALIANI, P., COLOGNATO, R., STRITZINGER, R., PONTI, J., PFALLER, T., KOHL, Y., OOMS, D., FAVILLI, F., LEPPENS, H., LUCCHESI, D., ROSSI, F., NELISSEN, I., THIELECKE, H., PUNTES, V. F., DUSCHL, A. & BORASCHI, D. 2011. Problems and challenges in the development and validation of human

cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. **Part Fibre Toxicol**, 8, 8.

PATIL, MP, BAYARAA, E., SUBEDI, P., PIAD, LLA, TARTE, NH, & KIM, GD (2019). Biogenic synthesis, characterization of gold nanoparticles using *Lonicera japonica* and its anticancer activity in HeLa cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 51, 83-90.

PIERSMA A. H. (2018). Workshop on acceleration of the validation and regulatory acceptance of alternative methods and implementation of testing strategies *Toxicol. in vitro*, 50 (2018), pp. 62-74.

RAHIM, S., ÜREN A. 2011. A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. **J Vis Exp**. pii: 2792.

RISS T. O seu ensaio MTT é realmente a melhor escolha? 2014 doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006.

ROGERS, N., FRANKLIN, N., APTE, S., BATLEY, G., ANGEL, B., LEAD, J., Baalousha, M. Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater. **Environmental Chemistry**, 7, (2010) p. 50-60.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SAHOO, S. Socio-ethical issues and nanotechnology development: perspectives from India, in 2010 10th IEEE **Conference on Nanotechnology** (IEEE-NANO), Seoul, South Korea, USA, 17–20 pp. 1205–1210. 2010.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of Microbiological Methods**, 54(2), 177–182. 2003.

SAWAI, J., SHOJI, S., IGARASHI, H., HASHIMOTO, A., KOKUGAN, T., SHIMIZU, M., & KOJIMA, H. (1998). Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. **Journal of fermentation and bioengineering**, 86 (5), 521-522.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.L.S.U.; FREITAS, L.D.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26: 726, 2003.

SCHEEL J., *et al.*, (2011). Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals (GHS). **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.59, n.3, p.471-92, 2011.

SCRACE, S., O'NEILL, E., HAMMOND, E. M. & PIRES, I. M. 2013. Use of the xCELLigence system for real-time analysis of changes in cellular motility and adhesion in physiological conditions. **Methods Mol Biol**, 1046, 295-306.

SZABO C., COLETTA, C., CHAO, C., MÓDIS, K., SZCZESNY, B., PAPAPETROPOULOS, A., HELLMICH, M.R. 2013. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 110(30):12474-9.

TAKAHASHI Y., *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an In Vitro Eye Irritation Test Using SIRC Cells. **Toxicol. In Vitro** 22,760-770.

TAKAHASHI, Y. *et al.*, 2011. The Short Time Exposure (STE) test for predicting eye irritation potential: Intra-laboratory reproducibility and correspondence to globally harmonized system (GHS) and EU eye irritation classification for 109 chemicals. **Toxicology In Vitro**, Akabane, v. 25, n. 1, p. 1425-1434, abr. 2011.

TIRUPPATHI, C., MALIK, A. B., DEL VECCHIO, P. J., KEESE, C. R. & GIAEVER, I. 1992. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 89, 7919-23.

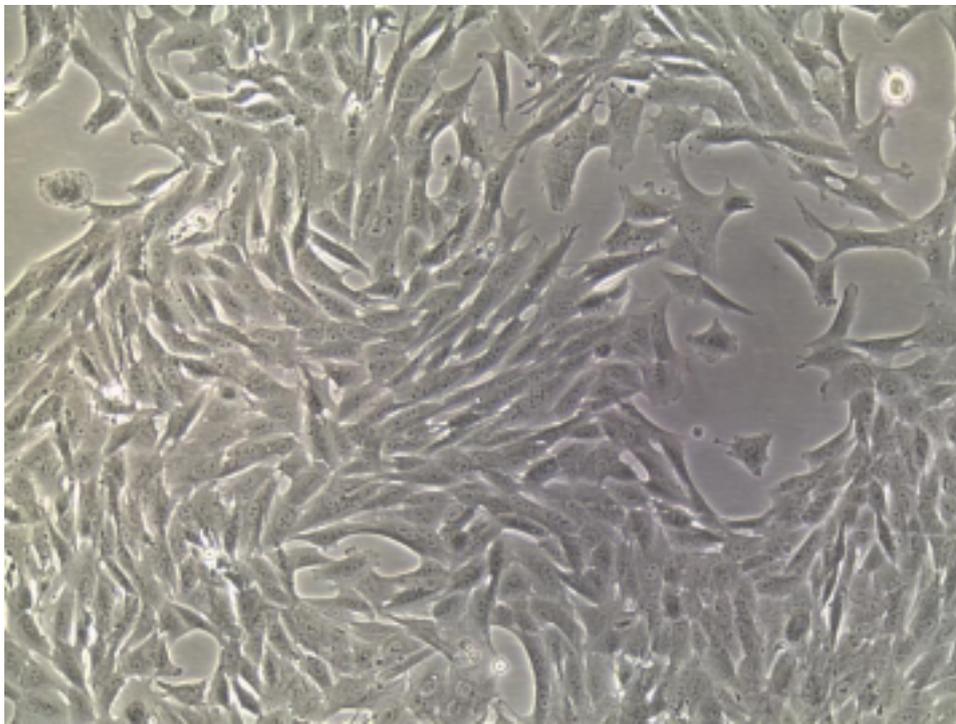
VERSTRAELEN S., AN JACOBS, BART DE WEVER, PHILIPPE VANPARYS, (2013) Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicol In Vitro**, v.27, n.4, p.1298-311, 2013.

WARHEIT, D.; 2018 Hazard and risk assessment strategies for nanoparticle exposures: how far have we come in the past 10 years? **F1000Res** 7: 376. 2018.

- WILHELMUS K.R., 2001. The Draize eye test Surv. **Ophthalmol.**, 45 (2001), pp. 493-515.
- XIAO C., LUONG, J. H. 2003. On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cellsubstrate impedance sensing (ECIS). **Biotechnol Prog**, 19, 1000-5.
- XIAO, C., LACHANCE, B., SUNAHARA, G. & LUONG, J. H. 2002. Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. **Anal Chem**, 74, 5748-53.
- XIE, Y.; HE, Y.; IRWIN, P. L.; JIN, T.; SHI, X. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2325–2331 Vol. 77, No. 7, April 2011.
- YEON, J. H. & PARK, J. K. 2005. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. **Anal Biochem**, 341, 308-15.
- YOUSEF, J. M.; DANIAL, E. N. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. **International Journal of Health Science**. V. 2, n. 4, p. 38-42, 2012.
- ZANDONELLA C. Cell nanotechnology: The tiny toolkit. **Nature**; 423: 10-12. 2003.

7. APÊNDICE 1

Figura 1: Fotomicrografia das células SIRC obtida no Laboratório de Biologia de Células Eucariontes (LABIO). (Objetiva de 20x).



8. ANEXO 1

Quadro 1. Critérios para a aceitabilidade dos resultados obtidos no ensaio STE em conformidade com o Guia TG 491 da OECD. Adaptado do Guia Diretriz para Teste de Produtos Químicos nº 491 (OECD).

<u>CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA O MÉTODO STE</u>
A densidade óptica do controle do meio obtida deve ser igual ou superior a 0,3 (após a subtração da densidade óptica do branco).
Em relação ao controle do meio, a viabilidade do controle do solvente deve ser igual ou superior a 80 %.
A viabilidade celular do controle positivo (SDS 0,01 %) deve manter-se dentro de dois desvios-padrão (DP) da série histórica (carta-control).
O DP da viabilidade celular final (três repetições independentes) deve demonstrar resultados inferiores a 15 %, para as concentrações de 5 % e 0,05 % da substância química em estudo. Para valores de DP maiores ou iguais a 15 %, três novas repetições devem ser realizadas.
Os limites superior e inferior do controle positivo devem ser atualizados de três em três meses.