

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Geovana de Carvalho Onorato

**Caracterização de nanopartículas de titanato de bário e citocompatibilidade em
fibroblastos bovinos cultivados *in vitro***

Juiz de Fora
2020

Geovana de Carvalho Onorato

Caracterização de nanopartículas de titanato de bário e citocompatibilidade em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Michele Munk Pereira

Juiz de Fora

2020

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

Onorato, Geovana de Carvalho.

Caracterização de nanopartículas de titanato de bário e citocompatibilidade em fibroblastos bovinos cultivados in vitro / Geovana de Carvalho Onorato. -- 2020.

27 p.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2020.

1. Nanotecnologia. 2. Nanotoxicologia. 3. Citotoxicidade. 4. Biocerâmica. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Título.

Geovana de Carvalho Onorato

Caracterização de nanopartículas de titanato de bário e citocompatibilidade em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 23 de novembro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Michele Munk Pereira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Rafaella de Souza Salomão Zanette
Universidade Federal de Juiz de Fora

Ma. Leonara Beatriz Fayer de Almeida
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

A Deus pois sem ele eu não teria sido capaz e não teria tido a força suficiente para superar cada obstáculo que surgiu ao longo desta caminhada.

À Universidade Federal de Juiz de Fora por ter me acolhido e guiado meu desenvolvimento profissional por meio dos ilustres e incríveis professores que tive a oportunidade de conhecer.

Agradeço às empresas de fomento à pesquisa FAPEMIG, CAPES, CNPq, REDE AGRONANO que proporcionaram e possibilitam minha dedicação total a este projeto.

À Embrapa que permitiu a realização deste trabalho por meio da brilhante parceria e por ter disponibilizado os equipamentos necessários a realização desta pesquisa.

À Michele pela orientação, pelos conselhos, por toda a dedicação e carinho ao longo deste período e fizeram com que eu apresentasse esse trabalho e crescesse como pesquisadora e aluna.

À minha família que foi meu suporte e jamais deixou de me incentivar na busca pelos meus sonhos e almejos profissionais. Obrigada a todos vocês.

Agradeço também a cada um que contribuiu direta ou indiretamente para realização desta pesquisa, pelo companheirismo, confiança e por terem acreditado que eu chegaria até aqui.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.” (SAGAN, Carl).

RESUMO

A nanotecnologia tem sido amplamente utilizada em diversas áreas para o melhoramento da resistência ou eficiência de produtos e a demanda por essa tecnologia no agronegócio tem sido crescente. As nanopartículas de Titanato de Bário (NP BaTiO₃) são utilizadas na biomedicina, porém, poucos são os estudos que avaliaram a citocompatibilidade e toxicidade dessas partículas em células de mamíferos, em específico são ausentes em células bovinas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de NP BaTiO₃ em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. O tamanho e potencial Zeta das NP BaTiO₃ foram avaliados utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a morfologia foi analisada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células foram cultivadas *in vitro* e expostas por 24 horas à diferentes concentrações de NP para avaliação da morfologia celular por microscopia de luz e citotoxicidade utilizando o ensaio de MTT. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de *Tukey*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados mostraram potencial Zeta de $-13 \pm 0,45$ mV, com tamanho médio de $149,27 \pm 0,81$ nm e índice de polidispersão de 0,37, com agregados evidenciados pelas imagens de MEV. A morfologia celular não mostrou alteração em nenhuma concentração. O teste de MTT revelou que exceto para a concentração de 10 µg/ml ($P < 0,05$), as NP BaTiO₃ não causaram alteração na atividade metabólica dos fibroblastos ($P > 0,05$). Nas condições experimentais deste estudo, os resultados demonstraram que as NP TiBaO₃ não causaram efeitos citotóxicos nos fibroblastos bovinos e sugerem um possível estímulo à proliferação celular na concentração de 10 µg/ml. No entanto, estudos complementares são necessários avaliando outros parâmetros de toxicidade para determinação da citocompatibilidade das NP TiBaO₃.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanotoxicologia. Citotoxicidade. Biocerâmica.

ABSTRACT

Nanotechnology has been widely used in several areas to improve products' resistance or efficiency, and the demand for this technology in agribusiness has been growing. The nanoparticles of Barium Titanate (NP BaTiO₃) are used in biomedicine. However, few studies have evaluated the cytocompatibility and toxicity of these particles in mammalian cells. In particular they are absent in bovine cells. Therefore, this study aimed to evaluate the cytotoxicity of NP BaTiO₃ in bovine fibroblasts grown in vitro. The size and Zeta potential of the NP BaTiO₃ were evaluated using the dynamic light scattering (DLS) technique, and the morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The cells were cultured in vitro and exposed for 24 hours to different concentrations of NPs to evaluate cell morphology by light microscopy and cytotoxicity using the MTT assay. The data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the means compared by the Tukey test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. The results showed a zeta potential of -13mV, with an average size of 149.267 nm and a polydispersion index of 0.37, with aggregates evidenced by the SEM images. Cell morphology showed no change in any concentration. The MTT test revealed that except for the concentration of 10ug / ml ($P < 0.05$), the NP BaTiO₃ did not cause changes in the metabolic activity of the fibroblasts ($P > 0.05$). In this study's experimental conditions, the results demonstrated that NP TiBaO₃ did not cause cytotoxic effects on bovine fibroblasts and suggest a possible stimulus to cell proliferation at a concentration of 10 ug / ml. However, further studies are needed to assess other toxicity parameters to determine the cytocompatibility of NP TiBaO₃.

Keywords: Nanotechnology. Nanotoxicity. Citotoxicity. Bioceramics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Agregado de NPs de BaTiO₃ observados através de microscopia eletrônica de varredura18
- Figura 2 – Avaliação da morfologia celular de fibroblastos bovinos expostos à NP de BaTiO₃ após 24 horas, sob aumento de 100x. (A) Controle; (B) 0.1 ug/mL; (C) 1ug/mL; (D) 10ug/mL; (E) 50ug/mL; (F) 100ug/mL.....19
- Gráfico 1 – Análise da viabilidade celular de fibroblastos bovinos expostos à NPs de BaTiO₃ por MTT. Porcentagem média de células viáveis após exposição às concentrações de 0 (controle); 0,1-100 µg ml⁻¹ de NPs de BaTiO₃ por 24 horas. *P<0,0520

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
EP	Erro padrão
ISO	<i>International Standard Organization</i>
MEV	Microscopia eletrônicas de varredura
NP	Nanopartículas
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFB	Soro fetal bovino
TiBaO ₃	Titanato de bário
USA	<i>United States of America</i>
UK	<i>United Kingdom</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Graus
%	Porcento
C	Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
HCl	Ácido clorídrico
M	Molar
mL	Mililitros
mg	Miligramas
mV	Milivolts
N ₂	Nitrogênio
nm	Nanômetros
ug	Microgramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	16
2.2	CULTURA CELULAR.....	16
2.3	EXPOSIÇÃO CELULAR ÀS NPs TiBaO ₃	17
2.4	MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	17
2.5	AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE.....	17
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
3	RESULTADOS	18
3.1	CARACTERIZAÇÃO.....	18
3.2	MORFOLOGIA CELULAR.....	19
3.3	CITOCOMPATIBILIDADE.....	20
4	DISCUSSÃO.....	21
5	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias cada vez mais avançadas tem sido regular na história da humanidade. No século 21, a nanotecnologia tem sido considerada uma das ciências mais promissoras, uma vez que ela pode resolver problemas que ainda são obstáculos em diversas áreas. Como resultado da aplicação da nanotecnologia, há grandes contribuições em novas patentes mundiais com produtos que usam essa tecnologia em áreas diversas (STUCKI & WOERTER, 2019). Segundo o endereço eletrônico STATNANO (<https://product.statnano.com/>), banco de dados internacional sobre produtos com nanotecnologia, os produtos patenteados com o uso de nanotecnologia estão dispersos desde a área médica até a automotiva e agricultura.

A possibilidade de manipular materiais em nanoescala é o que torna a nanotecnologia única, visto que nessa escala, as forças que atuam sobre a matéria são diferentes de quando estes estão na escala micro ou macro (SHAH *et al.*, 2018). Os nanomateriais são caracterizados por uma estrutura que tem ao menos uma dimensão (altura, largura, profundidade) menor que 100 nanômetros (nm), que é 10^{-7} metros (AKÇAN *et al.*, 2020). Por essa razão, os nanomateriais possuem propriedades físico-químicas peculiares como a maior área superficial, tornando os materiais nessa escala mais reativos (KARGOZAR & MOZAFARI, 2018). Dentre as diversas áreas de atuação da nanotecnologia, a da saúde é conhecida como nanomedicina, que busca prevenir, diagnosticar e tratar alguns tipos de doenças, como câncer (EL-ZAHABY & ELNAGGAR & ABDALLAH, 2019; LI *et al.*, 2020). A aplicação da nanotecnologia na área da medicina e na produção animal são análogas, uma vez que a saúde animal é uma grande preocupação para a segurança de alimentos, fazendo com que a nanotecnologia seja aplicada em antibióticos, entrega de nutrientes, biocidas, medicamentos veterinários e reprodução animal (HILL & LI, 2017)

As nanopartículas de Titanato de Bário (NP BaTiO₃) fazem parte do grupo das biocerâmicas, da família perovskita e possui propriedades piezoelétricas, caracterizada pela capacidade do material de responder à estímulos externos (SHAH *et al.*, 2018; CHOI *et al.*, 2020). Por apresentar tais características, na nanomedicina elas foram usadas como terapias anti tumor (MARINO *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2020), diagnóstico por imagem (WANG *et al.*, 2018), em redes de estímulo neural (ROJAS *et*

al., 2018), nanocarreadores de proteínas e fármacos (STEWART *et al.*, 2018) e na engenharia de tecidos (LI *et al.*, 2017; AMARAL *et al.*, 2019). Mesmo com o crescente número de aplicações com esse nanomaterial, não há muitas pesquisas que acessem a nanotoxicidade e citocompatibilidade desse material em células de bovinos.

Os modelos *in vitro* são sistemas de cultura que mimetizam o ambiente celular e suas respostas, permitindo experimentos em larga escala, reproduzíveis e mais econômicos (MCCRARY *et al.*, 2020). Eles são muito usados na toxicologia por possibilitar avaliar a interação e absorção de substância para dentro das células e os efeitos tóxicos primários, sem influências de efeitos secundários, como inflamações (GERDE & MALMLÖF & SELG, 2021). Permitem identificar mecanismos de toxicidade, efeitos agudos e doses mínimas para estabilidade da viabilidade celular, sendo muito importantes para prever a toxicidade de materiais e substâncias diversas e reduzir o número de estudos *in vivo* (SAVAGE & HILT & DZIUBLA, 2019).

As mesmas propriedades que fazem com que a nanotecnologia seja muito atrativa para o desenvolvimento de novos produtos, são aquelas que podem causar os maiores danos celulares e sistêmicos e, por isso, os nanomateriais devem ser testadas quanto a sua toxicidade (HUSSAIN *et al.*, 2020). Akçan e colaboradores (2020) destacam alguns parâmetros determinantes da toxicidade dos nanomateriais como: i) o tamanho, que irá influenciar a entrada nas células ou deposição deles em órgãos; ii) o formato, a composição da superfície e a carga que vai determinar qual o tipo de interação vai acontecer e conseqüentemente a resposta celular e; iii) a concentração no organismo, em que as respostas celulares são dose dependentes.

A nanotecnologia, por suas possibilidades diversas de aplicações, têm o agronegócio como um grande nicho para introdução de novos produtos, indo ao encontro de grandes demandas do mercado (SABOURIN *et al.*, 2015). A produção de vacinas veterinárias, terapias animais, reprodução e nutrição animal utilizando a nanotecnologia tem sido de grande importância para a saúde pública, diminuindo consumo de antibióticos e, assim, diminuindo resistência e resíduos farmacêuticos no leite e na carne (EL-SAYED & KAMEL, 2020). Com essa crescente demanda do uso de nanomateriais no meio agropecuário, cada vez mais trabalhos são necessários para atestar a segurança das nanopartículas e conhecer possíveis efeitos tóxicos dos nanomateriais em células de animais de produção.

Estudos para avaliar a citotoxicidade *in vitro* das NP BaTiO₃ são raros, especialmente, em células de mamíferos. Dubey, Thirivikraman e Basu (2015) não observaram efeitos tóxicos *in vivo* de implantes contendo compósitos de hidroxiapatita com NP BaTiO₃ em camundongos. Marino e colaboradores (2019) usaram NP BaTiO₃ funcionalizadas em células de glioblastoma, sem efeitos tóxicos em células saudáveis. Entretanto, ambos são estudos iniciais e utilizaram NP BaTiO₃ conjugadas com outros materiais, o que são fatores minimizantes da toxicidade, visto que a funcionalização diminui o potencial tóxico de NP (ABDELKHALIQ *et al.*, 2018; POPESCU & ANDRONESCU & VASILE, 2019). Mais recentemente, Amaral e colaboradores (2019) observaram citocompatibilidade de NP BaTiO₃ em células tronco mesenquimais humanas. Porém, em células bovinas, provenientes dos animais mais cultivados no mundo (TADJINE *et al.*, 2020), não há qualquer estudo sobre o efeito dessas NP.

Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar *in vitro* a citocompatibilidade de diferentes concentrações de NP BaTiO₃ puras quando em contato com células de fibroblastos bovinos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As NP BaTiO₃ foram obtidas da Sigma-Aldrich (USA). O tamanho médio e o potencial Zeta foram determinados com auxílio do Zetasizer Nano ZN (Malvern Instruments, UK) com a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para a análise, a suspensão de NP em concentração 100ug/mL foi dispersa em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), e a determinação realizada em temperatura ambiente em seis replicatas. A imagem em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi produzida em Field Emission Scanning Electron Microscope JSM-6701F JEOL, com a amostra depositada sobre suporte de silício. A voltagem utilizada foi de 6.0kV.

2.2 CULTURA CELULAR

Os fibroblastos bovinos foram obtidos a partir de um banco de células criopreservadas em meio DMEM e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell) e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO; Sigma), mantidos em nitrogênio (N₂) líquido no laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de tamanho T25 em meio DMEM, acrescido de 10% SFB e 1% antibióticos (10.000 unidades mL⁻¹ penicilina e 10.000 µg mL⁻¹ estreptomicina). O cultivo realizou-se em estufa incubadora (Estufa modelo RCO3000TVBB, Thermo Scientific, modelo 4130) a 37°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. As células cultivadas foram utilizadas em análises posteriores.

2.3 EXPOSIÇÃO CELULAR ÀS NP BaTiO₃

Os testes de citotoxicidade *in vitro* basearam-se na norma ISO 10993-5 (2009). Amostras de NP BaTiO₃ na concentração 1000µg/mL foram dispersas em meio de cultura celular DMEM, suplementado com 10% de SFB com auxílio de ultrassom com ciclos de 0,5 e amplitude de 70, sonicando por 20 segundos, quatro vezes, para a completa dispersão das NP. As culturas de fibroblastos (60% de confluência) foram divididas nos seguintes grupos experimentais: controle negativo absoluto (apenas meio de cultura) e cinco grupos testes expostos às NPs BaTiO₃ (nas concentrações de 0,1; 1; 10; 50; e 100 µg/mL). As células foram mantidas em estufa incubadora a 37° C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade por 24 horas.

2.4 MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ

O acompanhamento do crescimento dos fibroblastos bovinos dos diferentes grupos experimentais foi realizado com auxílio de microscopia de luz (Nikon TS100F, Nikon Instruments Inc., USA). Para avaliar o possível impacto da exposição das células às NP BaTiO₃, foram obtidas fotos dos fibroblastos bovinos (n=6), no aumento de 100x.

2.5 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE

A partir da cultura celular estabelecida, os fibroblastos bovinos foram dispostos em placas de 96 poços na densidade 2500 células/poço, divididos em 6 replicatas para cada tratamento de NP TiBaO₃ por 24 horas. Após esse tempo, a viabilidade celular foi avaliada após a exposição dos fibroblastos bovinos aos diferentes grupos experimentais pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (Sigma). Alíquotas de MTT na concentração de 5 mg/mL⁻¹ foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução em meio de cultura, por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, retirou-se o meio de cultura e adicionou Isopropanol-ácido 0.04 M HCl em cada poço e levado à incubadora por mais uma hora para a solubilização completa do precipitado. Em seguida, determinou-se a absorbância em espectrofotômetro empregando o comprimento de onda de 570 nm no equipamento Eon Microplate Reader (BioTek, USA). Os resultados da viabilidade celular nos grupos expostos às NP BaTiO₃ foram expressos em porcentagem e comparados com os grupos controles.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

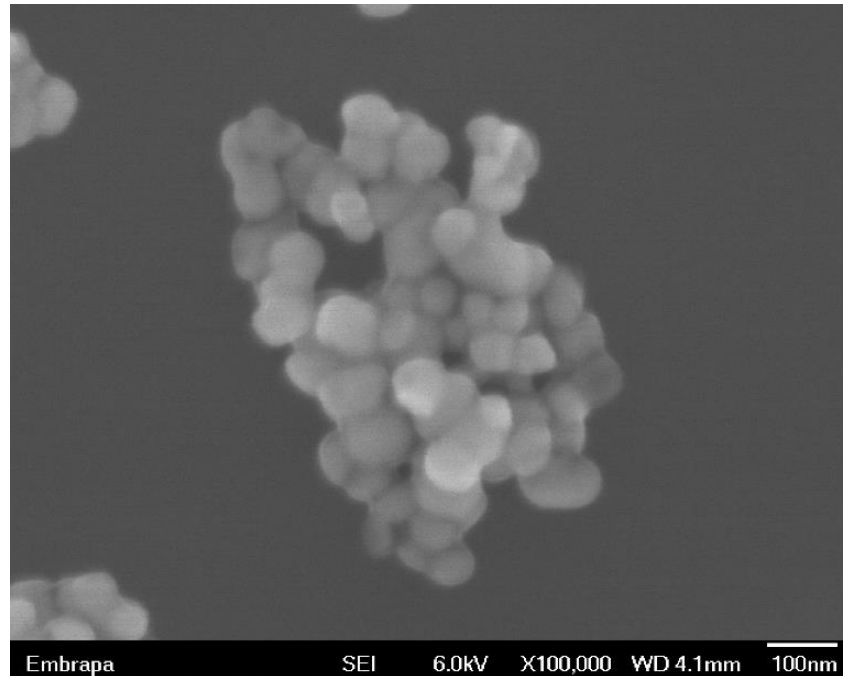
Os resultados da viabilidade celular foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de *Tukey*. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias ± erro padrão (EP) da média.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO

Em meio DMEM, o tamanho médio encontrado foi de 149,27±0,81 nm e o índice de polidispersão foi 0,37. O potencial Zeta da suspensão de NPs de TiBaO₃ em meio DMEM teve uma média de -13±0,45mV. As imagens obtidas por MEV evidenciaram a presença de agregados de NPs BaTiO₃ (Figura 1), onde é possível observar que as NPs têm tamanho próximo de 100nm e formato tetragonal.

Figura 1. Agregado de NPs de BaTiO₃ observados através de microscopia eletrônica de varredura.



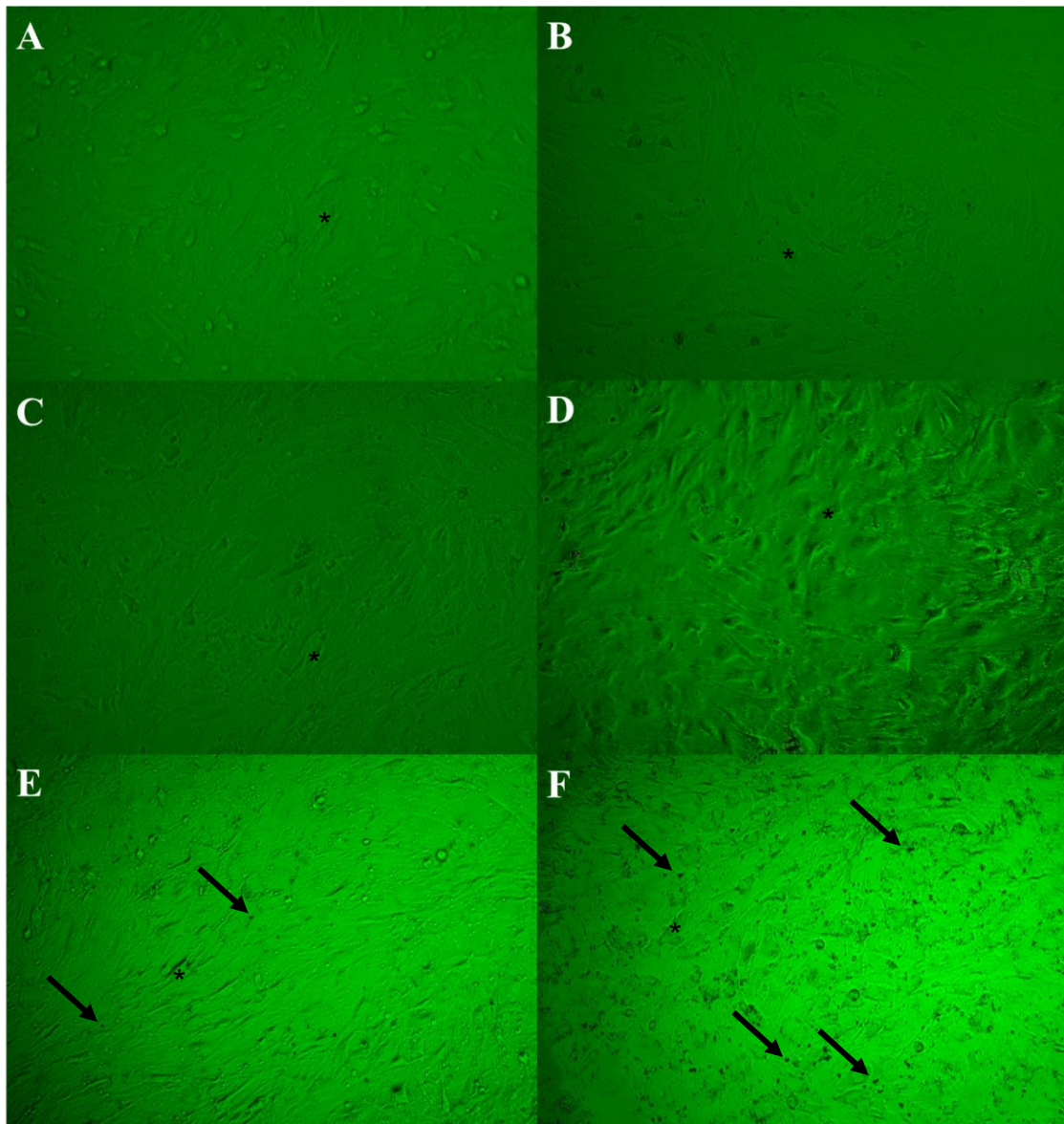
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

3.2 MORFOLOGIA CELULAR

Não observou-se alteração na morfologia celular dos fibroblastos bovinos, tipicamente fusiforme (KEIRA *et al.*, 2004), em nenhuma das concentrações de NPs, em comparação ao grupo controle (Figura 2). É possível observar pontos de agregação das NPs nas concentrações de 50 e 100ug/mL, indicadas pelas setas (Figura 2).

Figura 2 - Avaliação da morfologia celular de fibroblastos bovinos expostos à NP BaTiO₃ após 24 horas, sob aumento de 100x. (A) Controle; (B) 0.1 ug/mL; (C) 1ug/mL; (D) 10ug/mL; (E) 50ug/mL; (F) 100ug/mL. Setas indicam agregados.

*Fibroblastos bovinos



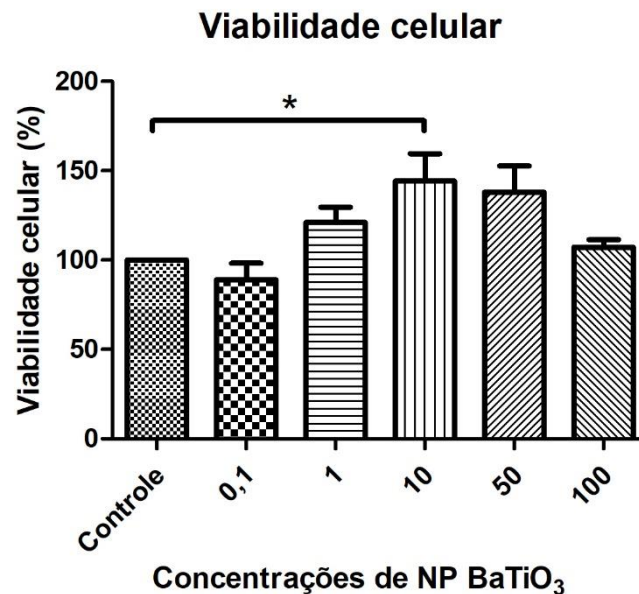
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

3.3 CITOCOMPATIBILIDADE

Os resultados do ensaio de MTT (Gráfico 1) demonstraram que, exceto a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, que aumentou a proliferação quando comparada ao controle ($P < 0,05$), o cultivo com as outras concentrações de NP TiBa3 não alterou significativamente a proliferação celular ($P > 0,05$).

Gráfico 1 - Análise da viabilidade celular de fibroblastos bovinos expostos à NPs BaTiO3 por MTT. Porcentagem média de células viáveis após exposição às concentrações de 0 (controle); 0,1-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de NPs BaTiO3 por 24 horas.

*P<0,05.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

4 DISCUSSÃO

Dependendo do meio em que se encontram, as NP podem apresentar propriedades físicas distintas, que podem alterar os efeitos delas sobre as células. Em meio DMEM, o índice de polidispersão foi 0,37, que caracteriza uma amostra polidispersa moderada. O potencial Zeta é utilizado como indicador de estabilidade de uma dispersão e é um dos fatores responsáveis pela interação da NP com compostos celulares. Quanto mais carregada, mais estável é a suspensão de NP. O potencial Zeta de $-13 \pm 0,45 \text{ mV}$, demonstra uma possível instabilidade da suspensão. Valores maiores que 30 mV (em módulo) do material particulado, geralmente são considerados estáveis por repulsão eletrostática (JIANG & OBERDÖRSTER & BISWAS, 2009). Essa instabilidade produz a formação de aglomerados, com várias NPs ligadas fracamente, ou de agregados, que são NP ligadas fortemente, difíceis de serem separadas e que geralmente ocorrem quando o potencial Zeta é menor que 20mV (SHRESTHA & WANG & DUTTA, 2020), o que pode influenciar a interação das NP com as células.

Dentre os fatores determinantes da toxicidade estão o tamanho e o formato das NP, cruciais para qualquer aplicação biomédica (FU *et al.*, 2018). O tamanho da

partícula irá influenciar na sua permeabilidade em determinados tecidos, além da sua maior probabilidade de ser fagocitada e a interação dela com receptores de membranas específicos, visto que quanto menor é a partícula, mais reativa ela é, por ter mais átomos livres em sua superfície (SINGH, 2019), podendo desencadear respostas imunológicas e bioacumulação em órgãos importantes, como o pulmão (SAVAGE & HILT & DZIUBLA, 2019; AKÇAN *et al.*, 2020). O tamanho médio de $149,27 \pm 0,81$ nm de uma amostra polidispersa pode indicar uma dispersão com tamanhos de partículas muito pequenas, e partículas formando agregados, que são evidenciados nas imagens de MEV, possivelmente sendo formados devido ao baixo valor modular do potencial Zeta.

Sabe-se que a forma do nanomaterial indica a aplicabilidade dele em diferentes áreas pelo tipo de interação celular que cada um apresenta (ROCA *et al.*, 2019). Os nanomateriais podem assumir diferentes formatos – fibras, esferas, tubos, cubos, anéis – e é conhecido que os esféricos são facilmente fagocitados, enquanto os fibrosos ou tubulares sofrem fagocitose incompleta, o que pode gerar uma resposta indesejada (SHAHRIAR *et al.*, 2012). Através da figura 1, podemos observar que as partículas possuem o formato tetragonal, estando de acordo com resultados visto na literatura que caracterizam essas NP com formatos cúbicos e tetragonais (CIOFANI *et al.*, 2010; CIOFANI & RICOTTI & MATTOLI, 2011; KIM *et al.*, 2019). NP de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) em diferentes tamanhos e formatos demonstraram respostas distintas para a biodistribuição e internalização celular (FU *et al.*, 2018).

A avaliação da morfologia celular é um importante parâmetro para acessar a toxicidade de um nanomaterial. Muitas NPs são tóxicas às células pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode afetar a dinâmica dos microtúbulos e, conseqüentemente, modificar a morfologia celular (MAO *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2017). De outra forma, NPs de óxido de cobre afetaram a disposição de filamentos de actina em células de raiz de *Arabidopsis* sp., causando crescimento anormal (JIA *et al.*, 2020), enquanto nanotubos de carbono modificaram a rede de actina do citoesqueleto de fibroblastos humanos, modificando sua morfologia e possivelmente comprometendo sua mecanotransdução (WU *et al.*, 2013). Mao e colaboradores (2015) observaram microtúbulos recuados e enrolados, com uma densidade reduzida e arranjo desordenado, em células SH-SY5Y expostas à NP de dióxido de titânio devido à interação direta das NP com os microtúbulos, que mudou o ambiente

eletrônico do microtúbulo, modificando a morfologia celular. Em estudos recentes desenvolvidos nesse mesmo grupo de pesquisa, foi observado que 24 horas de exposição à NP BaTiO₃, não causaram mudanças na morfologia de células tronco mesenquimais humanas (AMARAL *et al.*, 2019), corroborando, assim, com os resultados encontrados no presente estudo, em que não houve mudanças na morfologia celular dos fibroblastos bovinos.

O teste de MTT é difundido como um teste colorimétrico que avalia a viabilidade celular através da conversão do sal de tetrazólio pela membrana mitocondrial em cristais de formazam, e pode ser interpretado como indicativo de proliferação celular (VAN TONDER & JOUBERT & CROMARTY, 2015; PRÄBST *et al.*, 2017). Na área da nanotoxicologia, numerosos trabalhos usam esse teste como parâmetro inicial para avaliar a toxicidade de nanomateriais (BRAUN *et al.*, 2018; CASTELLANI *et al.*, 2018; AMARAL *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2019; GHAFARI *et al.*, 2019). No presente trabalho, a concentração de 10ug/mL estimulou a proliferação celular quando comparado ao grupo controle, resultado que corrobora com trabalhos anteriores que demonstraram que células osteoblásticas humanas mostraram maior adesão e proliferação ao serem expostas à NP BaTiO₃ (LYONS *et al.*, 2020) e que em altas concentrações de NP, a proliferação celular aumenta (POPOV *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016). Por outro lado, observou-se que a proliferação não foi alterada nas concentrações de 50 e 100ug/mL. Amaral e colaboradores (2019), ao exporem células tronco mesenquimais humana à NP BaTiO₃ por 24 horas, não obtiveram diferenças no teste de MTT, mesmo com altas concentrações, como no presente trabalho. Isso provavelmente ocorreu, pois nas concentrações de 50 e 100ug/mL, por ter ocorrido um aumento na formação de agregados de NP, e conseqüentemente, diminuição da disponibilidade de partículas livres para interação com as células. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os mecanismos pelos quais as NP de TiBaO₃, em determinadas concentrações, estimulam a proliferação de fibroblastos bovinos.

5 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste estudo as NP TiBaO₃ não causaram efeitos citotóxicos nos fibroblastos bovinos, demonstrando aumento da proliferação celular quando na concentração de 10ug/mL. Porém, estudos complementares são necessários avaliando outros parâmetros de toxicidade para determinação da

citocompatibilidade das NP TiBaO₃. Esse trabalho é inicial e abre novas perspectivas para o desenvolvimento de novos produtos na área com o uso das NP TiBaO₃.

REFERÊNCIAS

ABDELKHALIQ, Ashraf et al. Impact of nanoparticle surface functionalization on the protein corona and cellular adhesion, uptake and transport. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2018.

AKÇAN, Ramazan et al. Nanotoxicity; a challenge for future medicine. **Turkish Journal of Medical Sciences**, p. 50, 2020.

AMARAL, Danielle LAS et al. In vitro evaluation of barium titanate nanoparticle/alginate 3D scaffold for osteogenic human stem cell differentiation. **Biomedical Materials**, v. 14, n. 3, p. 035011, 2019.

BRAUN, Katharina et al. Comparison of different cytotoxicity assays for in vitro evaluation of mesoporous silica nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 214-221, 2018.

CASTELLANI, Stefano et al. Nanoparticle delivery of grape seed-derived proanthocyanidins to airway epithelial cells dampens oxidative stress and inflammation. **Journal of translational medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2018.

CIOFANI, G. et al. Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: Potential applications in biomedicine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 535-543, 2010.

CIOFANI, Gianni; RICOTTI, Leonardo; MATTOLI, Virgilio. Preparation, characterization and in vitro testing of poly (lactic-co-glycolic) acid/barium titanate nanoparticle composites for enhanced cellular proliferation. **Biomedical microdevices**, v. 13, n. 2, p. 255-266, 2011.

CHOI, Insung et al. Piezoelectricity of picosecond laser-synthesized perovskite BaTiO₃ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 511, p. 145614, 2020.

DONG, Li et al. Shape-dependent toxicity of alumina nanoparticles in rat astrocytes. **Science of the Total Environment**, v. 690, p. 158-166, 2019.

DUBEY, Ashutosh Kumar; THRIVIKRAMAN, Greeshma; BASU, Bikramjit. Absence of systemic toxicity in mouse model towards BaTiO₃ nanoparticulate based eluate treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 103, 2015.

EL-SAYED, Amr; KAMEL, Mohamed. Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19073-19086, 2020.

EL-ZAHABY, Sally A.; ELNAGGAR, Yosra SR; ABDALLAH, Ossama Y. Reviewing two decades of nanomedicine implementations in targeted treatment and diagnosis of pancreatic cancer: An emphasis on state of art. **Journal of Controlled Release**, v. 293, p. 21-35, 2019.

FU, Xinxin et al. Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 132, p. 169-187, 2018.

GHAFFARI, Hadi et al. Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. **Journal of biomedical science**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2019.

GERDE, Per; MALMLÖF, Maria; SELG, Ewa. In Vitro to ex Vivo/In Vivo Correlation (IVIVC) of dissolution kinetics from inhaled particulate solutes using air/blood barrier models: Relation between in vitro design, lung physiology and kinetic output of models. **Journal of Aerosol Science**, v. 151, p. 105698.

HILL, Emily K.; LI, Julang. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 26, 2017.

HUSSAIN, Zahid et al. A review of imperative concerns against clinical translation of nanomaterials: Unwanted biological interactions of nanomaterials cause serious nanotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 101867, 2020.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). ISO 10993-5 - Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva, 2009.

JIA, Honglei et al. Copper oxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the actin cytoskeleton dynamics in Arabidopsis roots. **Nanotoxicology**, v. 14, n. 1, p. 127-144, 2020.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER; G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 1, p. 77-89, 2009.

KARGOZAR, S.; MOZAFARI, M. Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 7, p. 15492–15500, 2018.

KEIRA, Sidney Mamoru et al. Experimental model for fibroblast culture. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, p. 11-16, 2004.

KIM, Youngtae et al. Highly Fluorinated Barium Titanate Nanoparticle Dispersion for Fabrication of Lithographically Patterned Thin Films. **Materials**, v. 12, n. 24, p. 4045, 2019.

LI, Yiping et al. Electroactive BaTiO₃ nanoparticle-functionalized fibrous scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 4007, 2017.

LI, Yong-Jiang et al. Emerging nanomedicine-based strategies for preventing metastasis of pancreatic cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 320, p. 105-111, 2020.

LYONS, Joseph G. et al. Nanostructured Biomaterials for Bone Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

MA, Xiaowei et al. Colloidal gold nanoparticles induce changes in cellular and subcellular morphology. **ACS nano**, v. 11, n. 8, p. 7807-7820, 2017.

MAO, Zhilei et al. Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. **Nanoscale**, v. 7, n. 18, p. 8466-8475, 2015.

MARINO, Attilio et al. Piezoelectric barium titanate nanostimulators for the treatment of glioblastoma multiforme. **Journal of colloid and interface science**, v. 538, p. 449-461, 2019.

MCCRARY, Michaela W. et al. Decellularized Tissues as Platforms for In Vitro Modeling of Healthy and Diseased Tissues. **Acta Biomaterialia**, 2020.

PRÄBST, Konstantin et al. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: **Cell viability assays**. Humana Press, New York, NY, p. 1-17, 2017.

POPESCU, Roxana Cristina; ANDRONESCU, Ecaterina; VASILE, Bogdan Stefan. Recent advances in magnetite nanoparticle functionalization for nanomedicine. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, p. 1791, 2019.

POPOV, A. L. et al. Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 406-413, 2016.

ROCA, Alejandro G. et al. Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 138, p. 68-104, 2019.

ROJAS, Camilo et al. Acoustic stimulation can induce a selective neural network response mediated by piezoelectric nanoparticles. **Journal of neural engineering**, v. 15, n. 3, p. 036016, 2018.

SABOURIN, Vincent et al. Commercial opportunities and market demand for nanotechnologies in agribusiness sector. **Journal of technology management & innovation**, v. 10, n. 1, p. 40-51, 2015.

SAVAGE, Dustin T.; HILT, J. Zach; DZIUBLA, Thomas D. In vitro methods for assessing nanoparticle toxicity. In: **Nanotoxicity**. Humana Press, New York, NY, p. 1-29, 2019.

SHAH, Aadil Abass et al. Antibacterial and antibiofilm activity of barium titanate nanoparticles. **Materials Letters**, v. 229, p. 130-133, 2018.

SHAHRIAR, Shari et al. Toxicity of nanomaterials. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 6, p. 2323-2343, 2012.

SHRESTHA, Sweta; WANG, Bo; DUTTA, Prabir. Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 102162, 2020.

SINGH, Sanjiv. Zinc oxide nanoparticles impacts: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 29, n. 4, p. 300-311, 2019.

STATNANO. **Informações e estatísticas sobre ciência, tecnologia e indústria baseadas em nanotecnologia**. 2020. Disponível em: <http://statnano.com>. Acesso em: 08 out. 2020.

STEWART, Tiffanie S. et al. Magnetolectric nanoparticles for delivery of antitumor peptides into glioblastoma cells by magnetic fields. **Nanomedicine**, v. 13, n. 4, p. 423-438, 2018.

STUCKI, T.; WOERTER, M. The private returns to knowledge: A comparison of ICT, biotechnologies, nanotechnologies, and green technologies. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 145, n. April, p. 62–81, 2019.

SUN, QINGQING; KANEHIRA, KOKI; TANIGUCHI, AKIYOSHI. Low doses of TiO₂-polyethylene glycol nanoparticles stimulate proliferation of hepatocyte cells. **Science and Technology of advanced Materials**, v. 17, n. 1, p. 669-676, 2016.

TADJINE, Dahmane et al. Pasteurization effects on yield and physicochemical parameters of cheese in cow and goat milk. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 580-587, 2020.

VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.

WANG, Yanfei et al. BaTiO₃-core Au-shell nanoparticles for photothermal therapy and bimodal imaging. **Acta biomaterialia**, v. 72, p. 287-294, 2018.

WU, Yun-Long et al. Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces. **Accounts of chemical research**, v. 46, n. 3, p. 782-791, 2013.

YOON, Yi Na et al. Barium titanate nanoparticles Sensitise treatment-Resistant Breast cancer cells to the Antitumor Action of tumour-treating fields. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.