



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

FELIPE GOMES PENTEADO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE  
FERRITAS DE MANGANÊS ( $MnFe_2O_4$ ) *IN VITRO***

BRASÍLIA

2018

FELIPE GOMES PENTEADO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE  
FERRITAS DE MANGANÊS (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia, na linha de Nanotoxicologia, no Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Departamento de Genética e de Morfologia, do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo.

BRASÍLIA

12 de junho de 2018

Dedico este trabalho à ordem e ao progresso; ao meu povo, o brasileiro; ao Senhor e à Senhora, que contribuíram e pagaram pela minha educação; uns com suor; outros com indiferença, seja anônima, seja não afirmativa.

## AGRADECIMENTOS

À **Dra. Maria Luiza Fascineli**, sempre fiel, minha razão e minha sensibilidade, por tudo e por mais que todos.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Bentes Azevedo**, pela sagacidade, pela bondade, pelo apoio, pelas oportunidades e pelas portas sempre abertas, por onde sempre passa a luz, por mais escuro que possa parecer ... (*!!! there's plenty of 'light and hope' at the bottom !!!*).

Ao **Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia**, pela permissão de uso de equipamentos do Laboratório de Genética Toxicológica (G-Tox), do Departamento de Genética e de Morfologia, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

À **Profa. Dra. Sônia Nair Bão**, pela orientação e consultoria na análise das amostras biológicas por meio de microscopia eletrônica de transmissão; à **Ingrid**, pela ultramicrotomia e microscopia das amostras.

Ao **Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo**, pela disponibilidade e paciência na intermediação das relações humanas.

Ao **Dr. Hannu Norppa** e à **Dra. Julia Catalán**, pela recepção cordial no *Finnish Institute of Occupational Health* (FIOH) e pela tutoria institucional.

À **Satu Suhonen**, pelo aconselhamento técnico na execução do Ensaio do Cometa, e à **Kukka Aimonen**, pelo acompanhamento na consecução do Teste do Micronúcleo.

À **Dra. Paolin Rocio Cáceres Vélez**, pela microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas.

A todos que aqui não me rememorei; mas, nem por isso, lhes esquecerei.

E, por fim, a mim, pela perseverança na eterna luta no dualismo entre o *tripalium* (o trabalho forçoso) e a *poiesis* (o prazer e a alegria da poesia) ... entre o urubu, que quer reinar e ostentar a graúda indumentária, e o pintassilgo-canário-sabiá, que o desafiam pela reinação, pela simplicidade e pela criatividade incessante do povo que vem daquela terra onde de tudo se dá e há; deste Brasil.

“Podemos ficar cegos para o óbvio, e também somos cegos para nossa própria cegueira.”

**Rápido e Devagar – duas formas de pensar (Daniel Kahneman)**

“Ignorância é achar que o seu ponto de vista é o ponto final.”

**Desconhecido**

## RESUMO

A nanotecnologia se afirma como revolução tecnológica universal. A ferrita de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) é um dos materiais nanotecnológicos em voga, pois possui características magnéticas e elétricas excepcionais, como o superparamagnetismo. Mas, como qualquer nova tecnologia, seus potenciais benefícios podem ser acompanhados de perigos e riscos de exposição antropogênica e ocupacional a essa classe de nanomateriais. No intuito de se avaliar seus potenciais citotóxicos e genotóxicos nesse cenário, e para se determinar se fatores como a concentração, o tempo de exposição, a via de síntese e a cobertura usada para a estabilização do coloide poderiam influenciar tal toxicidade, 5 apresentações de ferrita de manganês foram submetidas a uma bateria de 3 testes *in vitro*, em cultivos de linhagem celular representativa da via inalatória de exposição (epitélio bronquial humano imortalizado \_ BEAS-2B); foram eles: o ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina (25,6 a 256  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  por 6, 24 e 48 horas), o dano ao ácido desoxirribonucleico pelo ensaio do cometa (25,6 a 256  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  por 6 e 24 horas) e o dano cromossômico por fragmentação (clastogênese) ou perda de cromossomos inteiros (aneuploidia) pelo teste do micronúcleo (12,8 a 256  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  por 48 horas, com cotratamento tardio com citocalasina B, 6 horas após o início da exposição).

Os parâmetros essenciais e o comportamento das nanopartículas no meio de cultivo celular foram caracterizados; todas as nanopartículas foram internalizadas pelas células dentro de 6 horas de tratamento; nenhuma nanopartícula sintetizada por coprecipitação, com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpDmsa}$ ), e nenhuma sintetizada por decomposição térmica, com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ), causou efeito citotóxico ou genotóxico estatista e toxicologicamente significativo no regime de tratamento de até 153,6  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e por até 48 horas de exposição.

Esta é a primeira pesquisa comparativa a relatar os efeitos genotóxicos *in vitro* de nanopartículas de ferrita de manganês, com o mérito de ter realizado análise fatorial, a qual apontou que a citotoxicidade é determinada pela concentração, pelo tempo e pela cobertura; ao passo que, em relação aos parâmetros genotóxicos, o fator tempo foi um fator estatística e biologicamente significativo para o dano ao ácido desoxirribonucleico causado por ambas as nanopartículas cobertas com o citrato, independentemente da via de síntese.

**Palavras-chave:** Nanociência. Nanotecnologia. Nanotoxicologia. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Nanopartículas de ferrita de manganês.  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . BEAS-2B.

## ABSTRACT

The nanotechnology claims to be a universal technological revolution. The manganese iron oxide ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) is among the nanotechnological materials in focus, due to its unique magnetic and electric characteristics, such as superparamagnetism. Even though, like any other new technology, its potential benefits may be accompanied by hazards and risks of anthropogenic and occupational exposure to this class of nanomaterials. In order to assess its cytotoxic and genotoxic potential in this scenario, and to ascertain if factors such as concentration, time of exposure, synthesis route and coating used to stabilize the colloid would impact the toxicity, manganese iron oxide in 5 forms of presentation were challenged in a battery of 3 *in vitro* tests in cultures of a cell line representative of the inhalatory route of exposure (immortalized human bronchial epithelia \_ BEAS-2B); they were: the luminescent cell viability assay, based on the quantification of adenosine triphosphate (25.6 up to 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 6, 24 and 48 hours), the damage to the deoxyribonucleic acid, by the comet assay (25.6 up to 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 6 and 24 hours) and the chromosomal fragmentation (clastogenesis) or loss of whole chromosomes (aneuploidy), by the micronucleus test (12.8 up to 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 48 hours, and late cotreatment with cytochalasin B, 6 hours after the beginning of exposure).

The essential parameters as well as the behavior of the nanoparticles in the cell culture medium were characterized; all nanoparticles were uptaken by cells within 6 hours of treatment; none of the nanoparticles synthesized by coprecipitation, coated with citrate ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpCit}$ ) or meso-2,3-dimercaptosuccinic acid ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpDmsa}$ ), and none of those synthesized by thermal decomposition, and coated with citrate ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ) or meso-2,3-dimercaptosuccinic acid ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ), did cause any statistically or toxicologically significant cytotoxic or genotoxic effect in the concentration range up to 153.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and up to 48 hours of exposure.

This is the first *in vitro* comparative research to address the genotoxicity of manganese iron oxide nanoparticles, with the merit of a comparative factorial analysis, which pointed out that cytotoxicity is dictated by concentration, time and coating; in the other hand, regarding the genotoxicity end points, the time of exposure was a statistically and biologically significant factor for the damage to the deoxyribonucleic acid caused by both citrate-coated nanoparticles, independently of the synthesis route.

**Key words:** Nanoscience. Nanotechnology. Nanotoxicology. Cytotoxicity. Genotoxicity. Manganese iron oxide nanoparticles.  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . BEAS-2B.

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Cp	coprecipitação
Td	decomposição térmica
Cit	citrato
Dmsa	ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	nanopartículas de ferrita de manganês
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -Cp	nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CpCit	nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de citrato
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CpDmsa	nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -TdCit	nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -TdDmsa	nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	maguemita
TiO <sub>2</sub>	dióxido de titânio
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	óxido de alumínio
ZnO	óxido de zinco
SiO <sub>2</sub>	dióxido de silício
ξ	potencial zeta
ξ-H <sub>2</sub> O	potencial zeta em água molecular
ξ-BSA	potencial zeta em solução de albumina sérica bovina
Δζ	variação do potencial zeta (ξ-H <sub>2</sub> O - ξ-BSA)
D <sub>H10</sub>	diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 10% das nanopartículas contadas
D <sub>H50</sub>	diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 50% das nanopartículas contadas
D <sub>H90</sub>	diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 90% das nanopartículas contadas

$D_H$	diâmetro hidrodinâmico em água ultrapura
$D_{H_2O}$	diâmetro hidrodinâmico em água molecular
$D_{HBSA}$	diâmetro hidrodinâmico em solução de albumina sérica bovina
$D_{HLHC9}$	diâmetro hidrodinâmico em meio de cultivo lhc9
$\Delta_{DH}$	variação do diâmetro hidrodinâmico ( $D_{H_2O} - D_{HBSA}$ )
PDI	índice de polidispersão
PDI- $H_2O$	índice de polidispersão em água molecular
PDI-BSA	índice de polidispersão em solução de albumina sérica bovina
PDI-LHC9	índice de polidispersão em meio de cultivo lhc9
p	Significância estatística
t	valor da estatística do teste <i>t</i> de <i>Student</i>
r	tamanho do efeito derivado da estatística do teste <i>t</i> de <i>Student</i>
$\omega$	tamanho do efeito derivado da estatística da análise de variância
F	valor da estatística da análise de variância (anova)
$\chi^2$	valor da estatística do teste do qui-quadrado
$O_R$	<i>odds ratio</i> (razão de chances)
$\Phi$	<i>phi</i> de Kramer
R	valor do fator de correlação de Pearson
ATP	do trifosfato de adenosina
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
ERK1	quinase ativada por mitógeno 3
ERK2	quinase ativada por mitógeno 1
SAPK	quinase ativada por mitógeno 8
JNK	quinase c-jun n-terminal
PINK <sub>1</sub>	gene homólogo da fosfatase e tensina induzido pela quinase putativa 1
PARK <sub>2</sub>	gene da parkina 2
BSA	albumina sérica bovina
DNA	ácido desoxirribonucleico
LHC1	meio de cultivo celular <i>Laboratory of Human Carcinogenesis</i> nº 1
LHC9	meio de cultivo celular <i>Laboratory of Human Carcinogenesis</i> nº 9

RPMI 1640	meio de cultivo celular <i>Roswell Park Memorial Institute</i> nº 1640
PBS	tampão fosfato
DPBS	tampão fosfato de Dubelco
(-)Mg	sem adição de magnésio
(-)Ca	sem adição de cálcio
(-)Glu	sem adição de glutamina
MN	micronúcleo
IPBC	índice de proliferação com bloqueio da citocinese $\text{IPBC} = (\text{mononucleadas}_N * 1 + \text{binucleadas}_N * 2 + \text{multinucleadas}_N * 3) / 100$ <p style="text-align: center;">onde, N = número de células contadas na categoria</p>
OECD	<i>Organization for the Economic Cooperation and Development</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
CIC biomaGUNE	<i>Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales</i>
ULEI	<i>Universität Leipzig</i>
FIOH	<i>Finnish Institute of Occupational Health</i>
CAS#	número de registo na <i>Chemical Abstracts Service</i> , da <i>Chemical American Society</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> O Microscópio Eletrônico de Transmissão .....	21
<b>Figura 2.</b> O Zetasizer .....	22
<b>Figura 3.</b> O Nanosight .....	23
<b>Figura 4.</b> Propriedades de um nanomaterial que podem estar associadas à sua toxicidade .....	26
<b>Figura 5.</b> Biocinética de nanopartículas <i>in vivo</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Inventário de produtos nanotecnológicos (atualizado até março de 2015) .....	30
<b>Figura 7.</b> Fases potenciais do ciclo de vida de um nanomaterial e a identificação de possíveis perigos, eventos de risco e vias de exposição .....	31
<b>Figura 8.</b> Exposição ocupacional e experimental a óxidos metálicos .....	31
<b>Figura 9.</b> Deposição e translocação de nanopartículas no trato respiratório .....	32
<b>Figura 10.</b> Carcinogênese segundo a teoria das múltiplas etapas .....	34
<b>Figura 11.</b> Mecanismos e vias de ação de agentes genotóxicos e não-genotóxicos associados à carcinogênese .....	35
<b>Figura 12.</b> Delineamento hierárquico e fluxo experimentais do ensaio do cometa .....	37
<b>Figura 13.</b> Sistema semi-automatizado de análise digitalizada no ensaio do cometa, modelo de formação da cauda e mensuração da intensidade da cauda .....	38
<b>Figura 14.</b> Delineamento hierárquico e fluxo experimentais do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese .....	42
<b>Figura 15.</b> Critérios de identificação e contagem de micronúcleos pelo método de bloqueio da citocinese .....	44
<b>Figura 16.</b> Fluxo de eventos possíveis em células expostas a agente (cito)genotóxico durante o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese .....	45
<b>Figura 17.</b> Mecanismos possíveis de micronucleação nanogenotóxica .....	46
<b>Figura 18.</b> Cultivos celulares e micrografias de linhagem de epitélio bronquial humano exposta a nanomateriais e tipos celulares do trato respiratório .....	48
<b>Figura 19.</b> Representação de uma célula unitária de um espinélio $MFe_2O_4$ ( $M = Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}$ ) .....	51

<b>Figura 20.</b> Mecanismo bioquímico de produção de sinal luminescente no ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina .....	62
<b>Figura 21.</b> Forma e dimensões primárias de nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $MnFe_2O_4Cp$ ) .....	70
<b>Figura 22.</b> Forma e diâmetro primário de nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato ( $MnFe_2O_4-TdCit$ ) .....	71
<b>Figura 23.</b> Forma e diâmetro primário de nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $MnFe_2O_4-TdDmsa$ ) .....	71
<b>Figura 24.</b> Micrografia eletrônica de transmissão de monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês, pelo tempo de 6 horas e concentração de $51,2 \mu g.mL^{-1}$ .....	73
<b>Figura 25.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $MnFe_2O_4Cp$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de $25,6$ a $256 \mu g.mL^{-1}$ .....	75
<b>Figura 26.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de citrato ( $MnFe_2O_4CpCit$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de $25,6$ a $256 \mu g.mL^{-1}$ .....	76
<b>Figura 27.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $MnFe_2O_4CpDmsa$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de $25,6$ a $256 \mu g.mL^{-1}$ .....	78
<b>Figura 28.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato ( $MnFe_2O_4TdCit$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de $25,6$ a $256 \mu g.mL^{-1}$ .....	79

<b>Figura 29.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{TdDmsa}$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .....	81
<b>Figura 30.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com citrato (Cit), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ....	82
<b>Figura 31.</b> Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .....	83
<b>Figura 32.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{Cp}$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 256 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .....	91
<b>Figura 33.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpCit}$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 256 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .....	92
<b>Figura 34.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpDmsa}$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 204,8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .....	93
<b>Figura 35.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{TdCit}$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 204,8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .....	94
<b>Figura 36.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição	

térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $MnFe_2O_4$ TdDmsa), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	95
<b>Figura 37.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com citrato (Cit), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 12,8 a 102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	96
<b>Figura 38.</b> Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 12,8 a 102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	97
<b>Figura 39.</b> Micrografias de células binucleadas de monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) micronucleadas no teste com bloqueio da citocinese .....	104
<b>Figura 40.</b> Micrografias de monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados no teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese com nanopartículas de ferrita de manganês, pelo tempo de 48 horas e concentração de 51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	105
<b>Figura 41.</b> Morfologia esperada de nanopartículas de ferrita ( $MFe_2O_4$ ) sintetizadas por coprecipitação .....	108
<b>Figura 42.</b> Morfologia esperada de nanopartículas de ferrita ( $MFe_2O_4$ ) sintetizadas por decomposição térmica .....	110
<b>Figura 43.</b> Forças interagindo entre as nanopartículas de um coloide .....	113
<b>Figura 44.</b> Outros fatores importantes na estabilidade de um coloide .....	114
<b>Figura 45.</b> Moléculas de ácido cítrico (Cit) e de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa) e nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas por coprecipitação ou decomposição térmica e posteriormente estabilizadas com Dmsa .....	114
<b>Figura 46.</b> Série Hofmeister tradicional .....	115
<b>Figura 47.</b> Composição do meio de cultivo LHC9 .....	116
<b>Figura 48.</b> Cinética de nanopartículas em meio de cultivo .....	120

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Forma e dimensões de nanopartículas de ferrita de manganês caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão .....	72
<b>Tabela 2.</b> Diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas de ferrita de manganês caracterizado por rastreamento de partículas ( <i>Nanotracking</i> ) .....	72
<b>Tabela 3.</b> Diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial zeta de nanopartículas de ferrita de manganês caracterizados por espalhamento da luz ( <i>Zetasizer</i> ) .....	72
<b>Tabela 4.</b> Análise bifatorial para os fatores “Concentração” e “Tempo” (ANOVA 2-Way) no ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	86
<b>Tabela 5.</b> Análise multifatorial para os fatores “Tempo”, “Concentração”, “Cobertura” e “Síntese” (ANOVA 4-Way) no ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	89
<b>Tabela 6.</b> Análise bifatorial para os fatores “Concentração e Experimento” e “Concentração e Tempo” (ANOVA 2-Way) no ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	99
<b>Tabela 7.</b> Análise multifatorial para os fatores “Tempo”, “Concentração”, “Cobertura” e “Síntese” (ANOVA 4-Way) no ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	101
<b>Tabela 8.</b> Análise da replicação técnica das lâminas (correlação) e da variação causada pela amostragem dos poços (variação intracaso) em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	102
<b>Tabela 9.</b> Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	106

<b>Tabela 10.</b> Ensaios de viabilidade celular <i>in vitro</i> em diversas linhagens celulares submetidas a distintos regimes de tratamento, com as respectivas nanopartículas de ferrita de manganês ( $MnFe_2O_4$ ), e os principais fatores de variação do efeito .....	124
<b>Tabela 11.</b> Ensaios de biodistribuição e de toxicologia sistêmica <i>in vivo</i> em modelo murino tratado com nanopartículas de ferrita de manganês ( $MnFe_2O_4$ ) .....	125
<b>Tabela 12.</b> Ensaios de genotoxicidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em diversas linhagens celulares submetidas a distintos regimes de tratamento, com as respectivas nanopartículas ( $Fe_3O_4$ ), e os principais fatores de variação do efeito .....	126
<b>Quadro 1.</b> Conhecimento acumulado (retrospectiva) e diretrizes para a pesquisa em nanotecnologia para 2020 (perspectivas) quanto a questões ambientais, de saúde e de segurança .....	29
<b>Quadro 2.</b> Exploração das propriedades magnéticas e elétricas de nanomateriais contendo nanopartículas de ferrita de manganês ( $MnFe_2O_4$ ) para aplicações nanotecnológicas potenciais em diversas atividades econômicas .....	55
<b>Quadro 3.</b> Síntese dos resultados do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês .....	159
<b>Quadro 4.</b> Dados brutos do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação .....	160
<b>Quadro 5.</b> Dados brutos do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica .....	161
<b>Quadro 6.</b> Dados brutos do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com coberturas .....	162

<b>Quadro 7.</b> Síntese dos resultados do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês ...	163
<b>Quadro 8.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura (MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -Cp) .....	164
<b>Quadro 9.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e cobertura de citrato (MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CpCit) .....	165
<b>Quadro 10.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e cobertura de Dmsa (MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CpDmsa) .....	166
<b>Quadro 11.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição técnica e cobertura de citrato (MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -TdCit) .....	167
<b>Quadro 12.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição técnica e cobertura de Dmsa (MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -TdDmsa) .....	168
<b>Quadro 13.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com citrato (Cit) .....	169
<b>Quadro 14.</b> Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com ácido mên-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa) .....	170
<b>Quadro 15.</b> Dados brutos do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês e coberturas .....	171

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1. Nanociência e Nanotecnologia</b> .....	20
<b>1.2. Nanotoxicologia</b> .....	26
1.2.1. Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa)	36
1.2.2. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese .....	41
<b>1.3. Modelo Biológico</b> .....	47
<b>1.4. Modelo Nanotecnológico</b> .....	51
1.4.1. Aplicações .....	53
1.4.2. Funcionalizações .....	54
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	56
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	56
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	56
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	56
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
<b>4.1. Síntese dos nanomateriais</b> .....	57
<b>4.2. Caracterização dos nanomateriais</b> .....	57
4.2.1. Morfologia e diâmetro primário .....	57
4.2.2. Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico .....	58
<b>4.3. Ensaio biológicos</b> .....	59
4.3.1. Preparo das dispersões utilizadas nos tratamentos .....	59
4.3.2. Cultivo celular .....	59
4.3.3. Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do	
trifosfato de adenosina .....	61
4.3.4. Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa)	63
4.3.5. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese .....	66
4.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão .....	67
4.3.7. Análise estatística .....	68
<b>5. RESULTADOS</b> .....	69
<b>5.1. Caracterização dos nanomateriais</b> .....	69

5.2. Internalização dos nanomateriais .....	73
5.3. Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifostato de adenosina .....	74
5.3.1. Análise monofatorial (ANOVA 1-Way) .....	74
5.3.1.1. $MnFe_2O_4$ -Cp .....	74
5.3.1.2. $MnFe_2O_4$ -CpCit .....	75
5.3.1.3. $MnFe_2O_4$ -CpDmsa .....	77
5.3.1.4. $MnFe_2O_4$ -TdCit .....	77
5.3.1.5. $MnFe_2O_4$ -TdDmsa .....	79
5.3.1.6. Citrato (Cit) .....	80
5.3.1.7. Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa) .....	81
5.3.2. Análise bifatorial (ANOVA 2-Way) .....	83
5.3.3. Análise multifatorial (ANOVA 4-Way) .....	87
5.4. Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa) .....	90
5.4.1. Análise monofatorial (ANOVA 1-Way) .....	90
5.4.1.1. $MnFe_2O_4$ -Cp .....	90
5.4.1.2. $MnFe_2O_4$ -CpCit .....	91
5.4.1.3. $MnFe_2O_4$ -CpDmsa .....	92
5.4.1.4. $MnFe_2O_4$ -TdCit .....	93
5.4.1.5. $MnFe_2O_4$ -TdDmsa .....	94
5.4.1.6. Citrato (Cit) .....	95
5.4.1.7. Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa) .....	96
5.4.2. Análise bifatorial (ANOVA 2-Way) .....	97
5.4.3. Análise multifatorial (ANOVA 4-Way) .....	100
5.4.4. Análise da replicação técnica .....	102
5.5. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese .....	103
6. DISCUSSÃO .....	107
6.1. Caracterização dos nanomateriais .....	107
6.1.1. Nanopartículas sintetizadas por coprecipitação .....	107

6.1.1.1. <i>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp</i> .....	108
6.1.1.2. <i>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit</i> .....	109
6.1.1.3. <i>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa</i> .....	110
6.1.2. Nanopartículas sintetizadas por decomposição térmica .....	110
6.1.2.1. <i>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit</i> .....	111
6.1.2.2. <i>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa</i> .....	111
6.1.3. Comportamento em meio de cultivo .....	112
6.2. Ensaio biológicos com os nanomateriais .....	118
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	127
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	128
<b>9. APÊNDICES</b> .....	159
9.1. <b>Síntese dos resultados e dados brutos</b> – Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina .....	159
9.2. <b>Síntese dos resultados e dados brutos</b> – Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa) .....	163
9.3. <b>Síntese dos resultados e dados brutos</b> – Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese .....	171

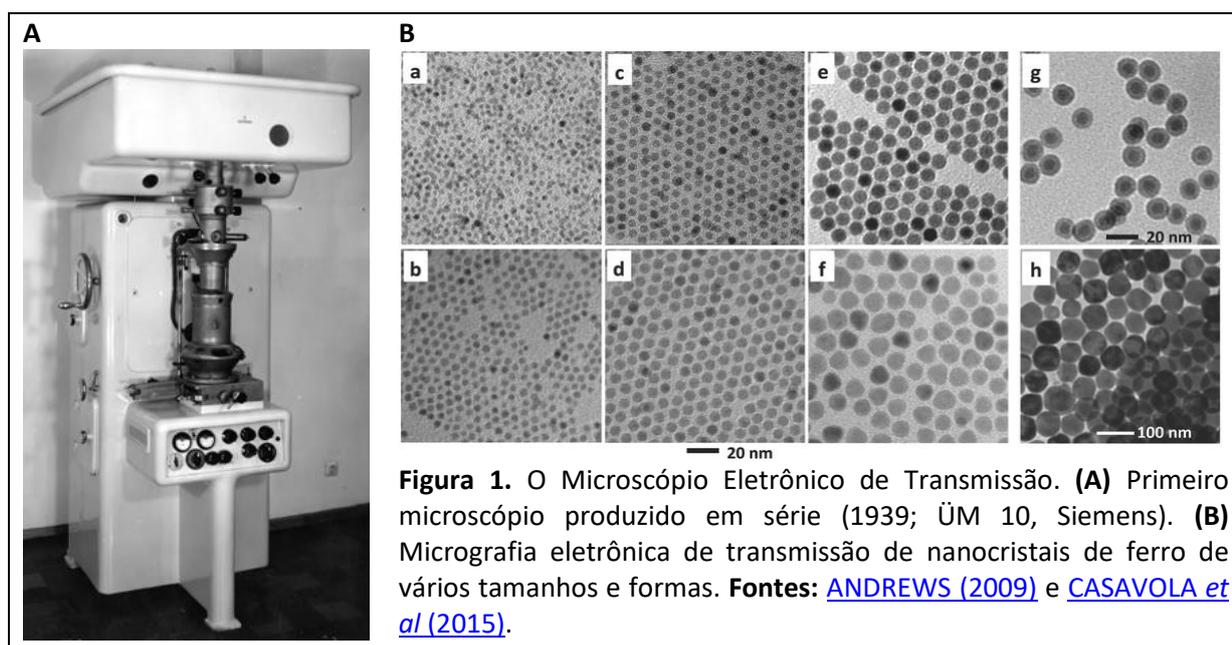
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Nanociência e Nanotecnologia

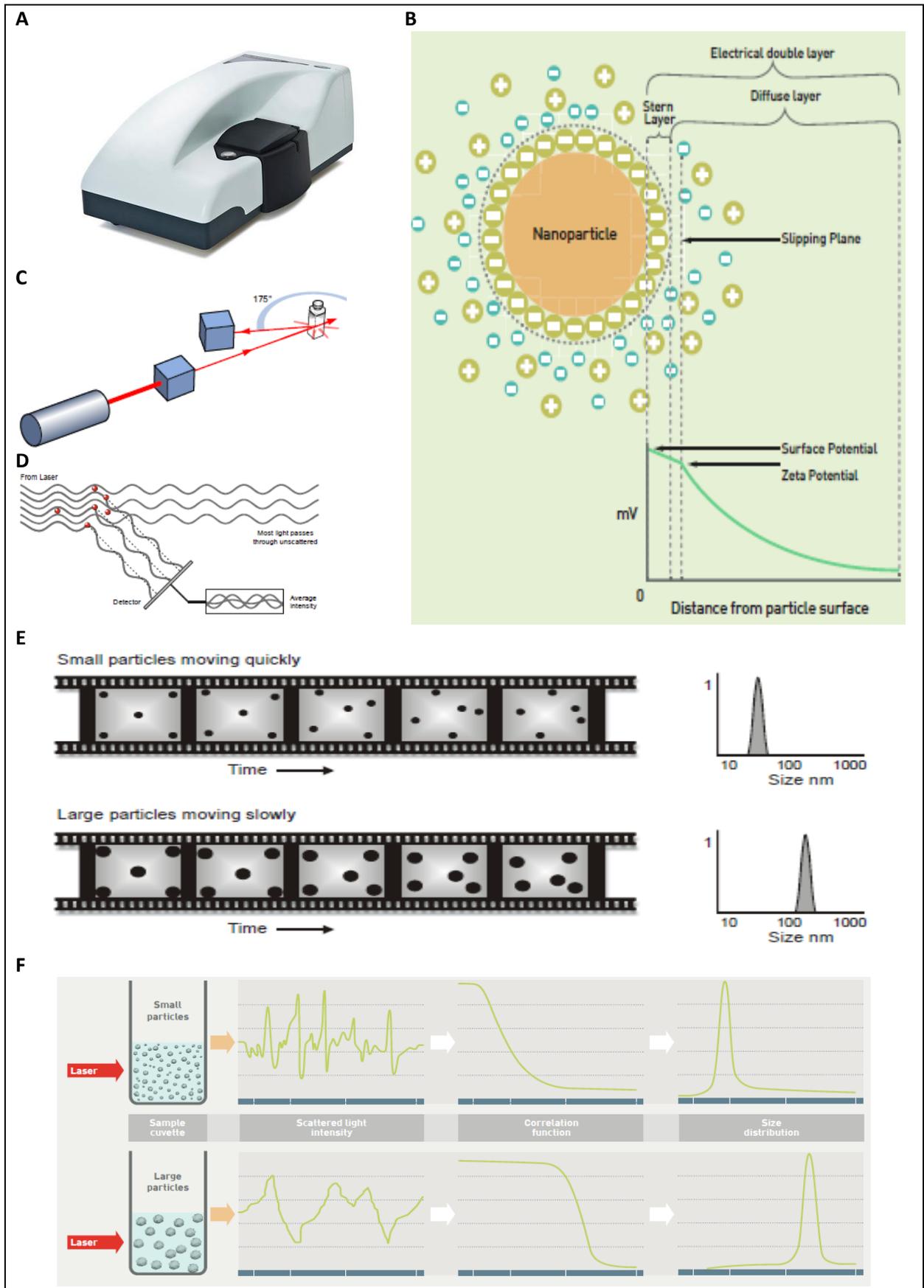
O entendimento dos conceitos de Nanociência e de Nanotecnologia, e também da justificativa do material e métodos empregados, necessita de uma breve explanação historicamente contextualizada, uma vez que evoluíram concorrentemente com os campos do conhecimento e as técnicas e tecnologias empregadas no objeto comum de seus estudos – a matéria observada e manipulada na escala nanométrica.

E em muito contribuiu o campo da ciência dos coloides, pelo processo investigativo da mudança de cor causada pela reflexão (esverdeada e opaca) e pela transmissão (avermelhada e brilhante) da luz sobre partículas coloidais de liga de prata e ouro aprisionadas em matriz vítrea durante a manufatura do “**Cálice de Licurgo**” (século IV antes de Cristo); fenômeno esse que já tinha sido objeto de estudo (Cassius, 1685; entre outros); mas foi **Faraday** (1857) quem, apesar de não dispor de metodologia ou instrumental para comprovar sua hipótese, correlacionou a ocorrência do fenômeno à variação do tamanho das partículas de ouro suspensas (relação tamanho-efeito), por meio da observação da mudança de cor na microscopia de projeção durante a síntese desse sol ([MAPPES et al, 2012](#)). Essa lacuna foi sanada pela inovação, que permitiu a primeira observação (magnificação resolvida) da matéria manipulada nessa escala em 1914, pelo químico **Richard Adolf Zsigmondy**, através do primeiro ultramicroscópio de imersão; a partir disso, ele propôs o primeiro sistema de classificação de partículas coloidais baseado em seu tamanho, e foi o primeiro a empregar formalmente o termo “nanômetro” ([SANTAMARIA, 2012](#); [NOBEL PRIZE ORGANIZATION, 2014](#); [HULLA et al, 2015](#)). Em outra ponta, **Louis de Broglie** (1923) introduziu o conceito de frequência e de comprimento de onda, abrindo o caminho para a ótica eletrônica, que culminou com a produção em série de microscópios eletrônicos de transmissão pela Siemens em 1939 ([HAGUENAU et al, 2003](#)); a visualização e a caracterização morfológica de estruturas na nanoescala então prosperaram, porque a frequência e o comprimento de onda em um feixe eletrônico acelerado e incidente sobre uma amostra permite a colisão desses elétrons com aqueles constitutivos daquela amostra, causando seu espalhamento; assim, a contrastação entre as áreas eletrodensas ou de espalhamento (escuras) e as menos eletrodensas ou de perpassamento (claras) permitiu a formação de imagens resolvidas da matéria nessa mesma escala (**Figura 1**).

No mesmo período, a noção de espalhamento da luz incidente sobre uma suspensão coloidal proposta por **Tyndall** (1868) foi desenvolvida por **Einstein** (1905), quem teorizou o movimento Browniano de partículas e depois incorporou preditores de flutuação térmica do dispersante propostos por **Smoluchowski** (1910); o físico **Jean-Baptiste Perrin** (1908) observou o movimento Browniano de nanopartículas, usando o ultramicroscópio de imersão, comprovando os preditores propostos por Einstein e Smoluchowski; no mesmo ano, **Mie** (1908) resolveu as equações de Maxwell para a absorção e o espalhamento de radiação eletromagnética por partículas esféricas metálicas; **Einstein** (1915) revisitou **Stokes** (1845) para relacionar o espalhamento e a fricção das partículas, o que dependeria de seu raio e da viscosidade do meio; **Debye** (1915) releu o espalhamento de **Raleigh** (1871), de que a cor do céu era causada pela refração angular da luz pelas partículas atmosféricas, destacando a importância do ângulo de refração, independentemente da massa, tamanho e forma das partículas; mas foi a partir dos trabalhos de **Pecora** (1964), e outros depois dele, que se resolveu o coeficiente de difusão ([STETEFELD et al, 2016](#); [HULLA et al, 2015](#)).



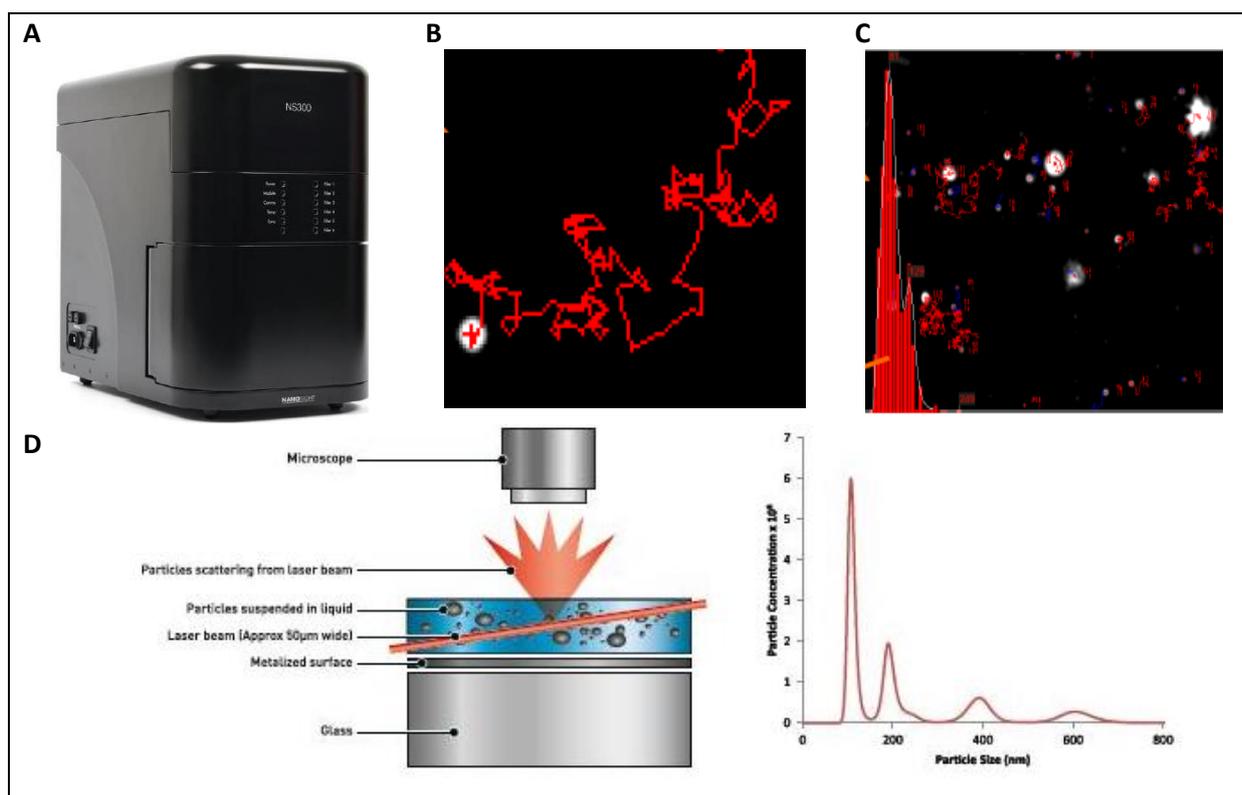
Amparada nessas últimas pesquisas, a Malvern Instruments comercializou o primeiro aparelho de espalhamento de luz (**Zetasizer**; **Figura 2**). O potencial zeta é obtido da mobilidade eletroforética e da velocimetria das nanopartículas de uma população amostrada de uma dispersão e submetidas a uma diferença de potencial elétrico; enquanto as nanopartículas se movem para o eletrodo de carga oposta a da sua superfície, a flutuação no espalhamento eletroforético da luz, que é proporcional a velocidade de deslocamento



**Figura 2.** O Zetasizer. **(A)** Zetasizer NanoZS. **(B)** Derivação do potencial zeta pelo espalhamento eletroforético da luz, a partir do modelo de dupla camada elétrica. **(C-F)** Estimação do diâmetro hidrodinâmico pelo método do espalhamento dinâmico da luz a 173°. **Fonte:** MALVERN (2013).

das nanopartículas, é usada para derivar o potencial zeta no plano de deslizamento. O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de outra população também é derivado da flutuação no espalhamento dinâmico da luz incidente a  $173^\circ$ , o qual varia em função desse diâmetro e da respectiva velocidade das nanopartículas em movimento browniano; isto é, a informação é representada graficamente como diâmetro em função da intensidade de espalhamento das nanopartículas (MALVERN, 2013).

Essa mesma empresa, baseada nesse mesmo princípio, passou a comercializar novo dispositivo (Nanosight; Figura 3), mas que utiliza técnica diferenciada; as nanopartículas de uma população amostrada de uma dispersão são rastreadas individualmente; o percurso do movimento browniano de cada nanopartícula é traçado pelo espalhamento e gravado (informação visual); o diâmetro hidrodinâmico é calculado em função do deslocamento registrado nas imagens seriadas e da estimativa do respectivo coeficiente de difusão, mas em função do número de partículas; ou seja, a informação é representada graficamente como diâmetro em função da concentração de nanopartículas (MALVERN, 2012).



**Figura 3.** O Nanosight. (A) Nanosight NS300. (B-C) Rastreamento individual de nanopartículas em movimento browniano. (D) Espalhamento de luz pelas nanopartículas. **Fonte:** MALVERN (2012).

As principais diferenças entre as duas metodologias acima relacionadas podem ser resumidas por FILIPE *et al.* (2010).

No percurso de todo esse progresso científico e tecnológico, foi **Richard Feynman** (1959) quem fundou conceitualmente a visão da nanociência (e da nanotecnologia) como a manipulação da matéria, a partir de seus elementos atômicos (“de baixo”, e abaixo na escala das grandezas físicas relacionadas ao tamanho), para estruturas mais complexas (“de cima” ou “para cima” nessas escalas), o que também exigiria o desenvolvimento de ferramental adequado a essa manipulação (como microscópios de maior resolução, entre outros, que se tornaram realidade, como anteriormente explicitado). **Norio Taniguchi** (1974) capturou esse conceito por meio do termo “nanotecnologia”, que seria “o processamento, a separação, a consolidação e a deformação dos materiais em um único átomo ou molécula”. **Eric Drexler** (1981) incorporou à visão conceitual a noção de engenharia, através do delineamento e da especificação da composição atômica de moléculas e de estruturas mais complexas. Mas foram **Harry Kroto** e colegas (1985) que provaram plausíveis tais visões, quando engenhosamente sintetizaram o fulereno e o estudaram por meio da microscopia de força atômica, outra inovação; conhecimento esse a partir do qual **Sumio Iijima** (1991) sintetizou os nanotubos de carbono de múltiplas paredes; e os nanotubos, também posteriormente sintetizados por outros grupos e outras vias, foram a primeira classe de nanomateriais empregada industrialmente ([SANTAMARIA, 2012](#); [HULLA et al, 2015](#)).

Portanto, a nanociência saiu da visão ([SANTAMARIA, 2012](#)) e se conformou epistemologicamente como área **interdisciplinar** do conhecimento, a partir da convergência de disciplinas, e isso continua exigindo um processo de “**nanoalfabetização**” envolvendo 5 atores: academia, indústria, governo, organizações governamentais e população ([YAWSON, 2012](#)); até por causa da dimensão ética da nanotecnologia ([KUZMA & BESLEY, 2008](#)). Trata-se, então, de fronteira do conhecimento ([SAHU, 2015](#)) e de convergência de processos e diversos campos de conhecimento (ciências naturais, biológicas, da saúde, humanas, sociais, entre outras mais); de concatenação de esforços e recursos para único objeto de estudo. Não foi à toa que [ROCO & BAINBRIDGE \(2003\)](#), no bojo da iniciativa estadunidense de nanotecnologia, declararam que a **convergência** é baseada na unidade material na nanoescala, pois os blocos de construção da matéria que são fundamentais e comuns a todas as ciências se originam nessa escala; portanto, a interação desses campos pelo seu fator comum seria a chave transformadora para o desenvolvimento de tecnologias **NBIC** (nano-bio-info-cogno); a nanotecnologia introduz uma matriz, uma estrutura comum ([NORDMANN, 2004](#)). A ciência (nanociência) baseada em conceitos unificados da matéria na

nanoescala fornece uma nova base para a produção de conhecimento e a inovação tecnológica ([ROCO & BAINBRIDGE, 2006](#)), de sorte que sua própria aplicação social e industrial (nanotecnologia) depende dessa integração ([ROCO et al, 2013](#)).

Também, é interessante a **circularidade** relatada por [MARCOVICH & SHINN \(2009\)](#), pela qual, na nanociência e na nanotecnologia, a forma é, ao mesmo tempo, meio e objeto de estudo; a forma torna-se um sistema de explicação, de interpretação, de verificação dos resultados e de compreensão de fenômenos; trata-se de uma cultura do procedimento científico articulada em torno da noção de morfologia. Ainda, segundo [BURSTEN et al \(2016<sup>1</sup>\)](#), os conceitos físicos, como os de superfície e de continuidade de um material, são dependentes da escala; ou seja, a estrutura dos conceitos deve seguir a estrutura dos sistemas que elas intentam representar; tanto é que, apesar de um nanomaterial ser distinto de um material em macroescala, também é diferente dos átomos isolados que o constituem, de modo a se configurar o **Paradoxo de Sorites**: quando uma amostra desse material é pequena (escala subnanométrica) ou grande demais (escala suprananométrica), as propriedades cessam e ele deixa de ser um nanomaterial; portanto, seriam as propriedades dependentes da escala que definiriam o que seria um nanomaterial ([BURSTEN, 2016<sup>2</sup>](#)).

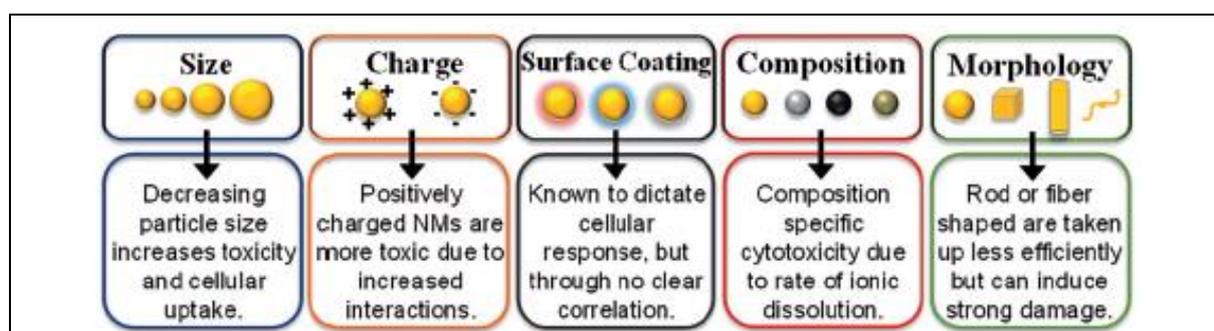
Como destacado por [EL-SAYED \(2001\)](#): (1) se as propriedades físicas de um material dependem do tipo e da velocidade de movimentação que seus elétrons podem executar; (2) se esses parâmetros estão condicionados pela distância entre cada átomo e o espaço disponível entre eles para esse deslocamento; (3) se essas características derivam diretamente da forma e da dimensão desse material; e (4) se essa conformação é determinada pela composição atômica do material; (5) logo, o controle elemental da matéria e sua formatação morfológica na nanoescala reduzem essas distâncias e esses espaços, o que, por fim, repercute na manifestação de novas propriedades quânticas, ou de “**efeitos do confinamento espacial**”; quando um elétron está ligado ao orbital de um átomo ou de uma molécula, não está livre (isto é, está confinado), e sua movimentação também está confinada e tem energia discreta (quantidade definida); o comportamento quântico da matéria passa a se subordinar a suas características físicas de composição, forma e tamanho.

Por conseguinte, e apesar das várias definições de nanociência e nanotecnologia na literatura, e das mais citadas serem aquelas delimitadas por órgãos ou agências públicas ([YAWSON, 2012](#)), aquelas trazidas e contextualizadas por [MELO & PIMENTA \(2004\)](#) e [GOMES & MELO \(2004\)](#) capturam a estrutura conceitual, a qual, tratando de ontologia, representa

uma categorização daquilo que existe no mundo da maneira mais completa e geral possível ([KASAMA, 2009](#)). O desenvolvimento sinérgico da **Nanociência** – como pesquisa básica e produção de conhecimento através da observação e da explicação de fenômenos na escala atômica – e da **Nanotecnologia** – como pesquisa aplicada à translação desse conhecimento e o aproveitamento desses fenômenos para a intervenção na realidade que se deseja manipular –, têm sua motivação na inovação e na persecução da convergência (várias propriedades em uma mesma estrutura) e da miniaturização (uma estrutura cujas dimensões jazem dentro da nanoescala), pois tratam de novos fenômenos quânticos, manifestados pelo confinamento espacial e temporal da matéria nessa escala.

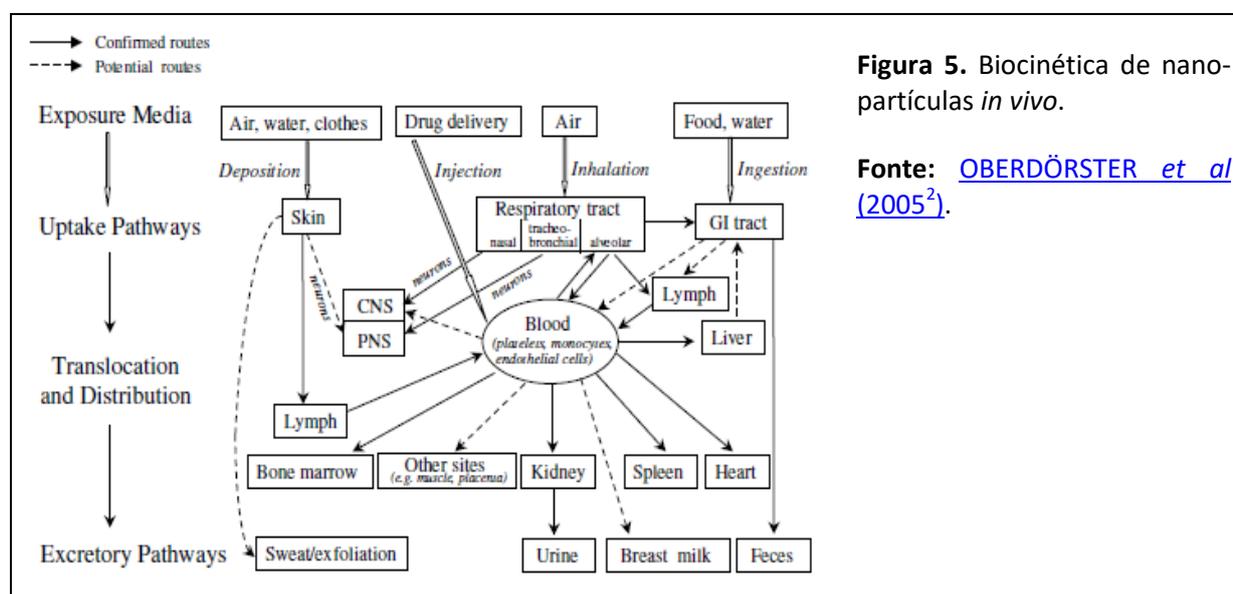
### 1.2. Nanotoxicologia

A nanotecnologia se afirma como **revolução** tecnológica universal; parece ser admitida como fator inovador em todos os campos do empreendimento humano; como qualquer nova tecnologia, seus potenciais benefícios podem ser acompanhados de perigos e riscos; e é exatamente esse o ponto de **precaução** – nanomateriais possuem propriedades novas, e como podem se comportar de maneira singular, podem ser toxicologicamente ativos (ou mais reativos), e os perigos e riscos associados também podem ser inovações (**Figura 4**); deve ser considerado o potencial de indução de **efeitos citotóxicos, genotóxicos, inflamatórios** e até mesmo de **câncer**; portanto, a nanotoxicologia está se desenvolvendo paralelamente à nanotecnologia, para definir os perigos e os riscos associados; só quando esses elementos forem identificados é que os pontos críticos poderão ser controlados; além disso, como os nanomateriais estão se integrando cada vez mais na economia, muitos têm reconhecido a necessidade da identificação prospectiva desses pontos numa abordagem responsável ([CURTIS et al, 2006](#); [SAVOLAINEN et al, 2010](#); [MAYNARD, 2012](#); [HUSSAIN et al, 2015](#)).



**Figura 4.** Propriedades de um nanomaterial que podem estar associadas à sua toxicidade. **Fonte:** [HUSSAIN et al \(2015\)](#).

O desenvolvimento nanotecnológico deverá incrementar a fonte antropogênica de exposição de nanomateriais pelas diversas rotas ([OBERDÖRSTER et al, 2005<sup>1</sup>](#); **Figura 5**). Recomendou-se a prevenção dessa exposição por ações de precaução ([OBERDÖRSTER, 2010](#)) e a adoção da seguinte **estratégia de avaliação** da toxicidade: caracterização físico-química (para se correlacionar as características aos efeitos), ensaios celulares *in vitro* (para se isolar os mecanismos e as vias de ação), ensaios não celulares *in vitro* (solubilidade, persistência, etc), e ensaios *in vivo* ([OBERDÖRSTER et al, 2005<sup>2</sup>](#)). Mesmo assim, não se pode generalizar que todo nanomaterial seja genotóxico ou que a nanoescala aumentará esse efeito ([NORPPA et al, 2011](#); [DONALDSON & POLAND, 2013](#)). Como há **incerteza** sobre a real toxicidade dos nanomateriais ([MIHALACHE et al, 2017](#)), permanecerá o contraste entre os juízos de valor da nanociência (o peso da evidência e seus elementos quantitativos) e os juízos de valor sociais ou da ciência da precaução (que aceita elementos qualitativos); e esforço deverá ser empregado para tratar do aspecto social da nanotecnologia ([ELLIOT, 2013](#); [KUZMA & BESLEY, 2008](#)), inclusive com amparo em estudos de **toxicologia** (observação e descrição) associados à **modelagem** (predição) ([LOUREIRO et al, 2015](#)).



**Figura 5.** Biocinética de nanopartículas *in vivo*.

Fonte: [OBERDÖRSTER et al \(2005<sup>2</sup>\)](#).

A **segurança** dos produtos contendo nanomateriais foi uma preocupação social precoce, pois, apesar das expectativas de adequação das técnicas de avaliação de risco tradicionalmente aplicadas às substâncias químicas, vários relatos demonstraram especificidades nessa avaliação: novas rotas de exposição e vias de translocação; dosimetria e biocinética dependentes das propriedades e características da nanoescala (tamanho, carga, forma, entre outros); e novas aplicações levariam a novos mecanismos de interação

([HULLA et al, 2015](#)). E, apesar de materiais serem biocompatíveis e aprovados pela *United States Food and Drug Administration (USFDA)* para uso clínico nas formas de apresentação em micro e macroescala, isso não exclui direta e objetivamente o potencial tóxico desses materiais apresentados na nanoescala ([LOUREIRO et al, 2015](#)). Na verdade, desde o início da iniciativa estadunidense de nanotecnologia, houve preocupação a respeito da nanotoxicidade, uma vez que, desde a década de 1970, já se havia acumulado conhecimento a respeito da toxicidade diferenciada das partículas ultrafinas (< 100 nm) em relação às de maior diâmetro, quando inaladas; já se sabia da importância do tamanho das partículas sobre sua toxicidade; e, ainda na década de 1990, foram publicados relatórios a respeito da toxicidade inalatória de nanopartículas (TiO<sub>2</sub> e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); em 2004 começaram a ser publicados estudos comprovando a toxicidade inalatória de nanotubos de carbono; até que o termo “**nanotoxicologia**” foi primeiramente empregado por DONALDSON e colegas (2004) e o periódico “*Nanotoxicology*” foi lançado (2007) ([SANTAMARIA, 2012](#)). Ainda, em 2004 a *Royal Academy of Engineering* tinha publicado o relatório “[Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties](#)”, onde destacava a necessidade de geração e consolidação de informação sobre os riscos e perigos associados à nanotecnologia ([SINGH et al, 2009](#)). Posteriormente, vários estudos reiteraram casos de associação inversa tamanho-efeito: quanto menor o tamanho, maior o efeito, possivelmente atribuível ao grau de internalização e a alta relação entre área e volume ([LOUREIRO et al, 2015](#)).

A questão da segurança e de sua percepção é tamanha que se consolidou como uma necessidade da sociedade (uma preocupação ética essencial) e uma **prioridade de pesquisa** fundamental até 2020 (**Quadro 1**), e há a consciência de que os nanomateriais ainda devem ser estudados caso-a-caso, ao invés de se pressupor antecipadamente qualquer similaridade de efeito por similitude de composição ou síntese, de sorte que se possa discernir quais propriedades específicas estão associadas aos efeitos observados ([ROCO et al, 2010](#); [ELLIOT, 2013](#); [LOUREIRO et al, 2015](#)). Isso porque o atual e intensivo progresso científico e tecnológico estimulou o crescimento cumulativo dos danos ambientais ([ZHIRONKIN et al, 2011](#)). Nesse aspecto, foi a própria convergência que forneceu o estratagema para, ao mesmo tempo, orientar a pesquisa básica e compatibilizar os mecanismos de manutenção da ação desejada (nanotecnologia) e a prevenção da reação indesejada (nanotoxicologia) no compartimento biológico (biocompatibilidade e segurança). Segundo [ROCO & BAINBRIDGE \(2006\)](#), a convergência é essencial, pois o efeito toxicológico parece óbvio para alguns

apenas quando a citotoxicidade é aguda e significativa, mas é conhecido que a toxicidade de alguns nanomateriais é complexa e envolve interações específicas; e a premissa de que coberturas (como albumina ou sílica) tornariam biocompatíveis esses nanomateriais (que podem ser constituídos de metais pesados tóxicos) pode demonstrar-se equivocada.

**Quadro 1.** Conhecimento acumulado (retrospectiva) e diretrizes para a pesquisa em nanotecnologia para 2020 (perspectivas) quanto a questões ambientais, de saúde e de segurança.

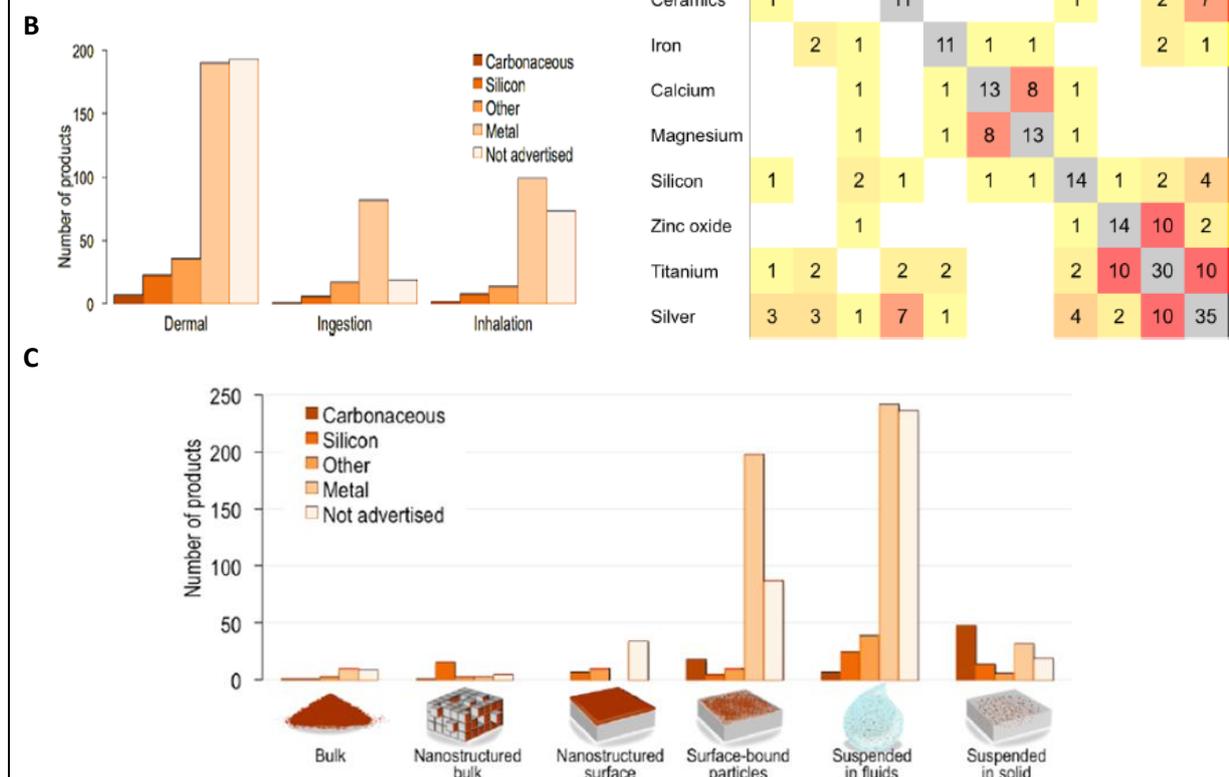
Retrospectiva	Perspectivas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- As propriedades únicas dos nanomateriais permitem uma gama de interações com moléculas e processos biológicos que podem constituir tanto perigos e riscos quanto oportunidades de diagnóstico e de tratamentos</li> <li>- Os perigos devem ser avaliados em função das características dos nanomateriais na nanoescala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudar a interface nano-bio pelo desenvolvimento de instrumental e de metodologias que esclareçam as propriedades e as interações biologicamente representativas para a avaliação de risco e para o delineamento seguro e mais eficaz</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- As vias de efeito toxicológico em modelos celulares (preditivos) constituem base científica incremental e robusta para a identificação das propriedades dos nanomateriais relacionadas a perigos</li> <li>- A produção de espécies reativas (radicais livres) é um mecanismo hierárquico importante e pode ser utilizada para se ranquear e agrupar nanomateriais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Empregar essas vias como base ou plataformas de seleção, ranqueamento e priorização de nanomateriais para estudos de validação em modelos animais</li> <li>- Validar a comparabilidade em sistemas celulares e animais obtidos no segmento linear da relação concentração-resposta</li> <li>- Desenvolver métodos experimentais e preditivos da exposição a vários nanomateriais e por várias rotas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protocolos harmonizados validados por ensaios inter-laboratoriais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desenvolver protocolos padronizados e estratégias de avaliação durante todo o ciclo de vida do nanomaterial</li> </ul>

Fonte: [\(ROCO et al, 2010\)](#), com modificações.

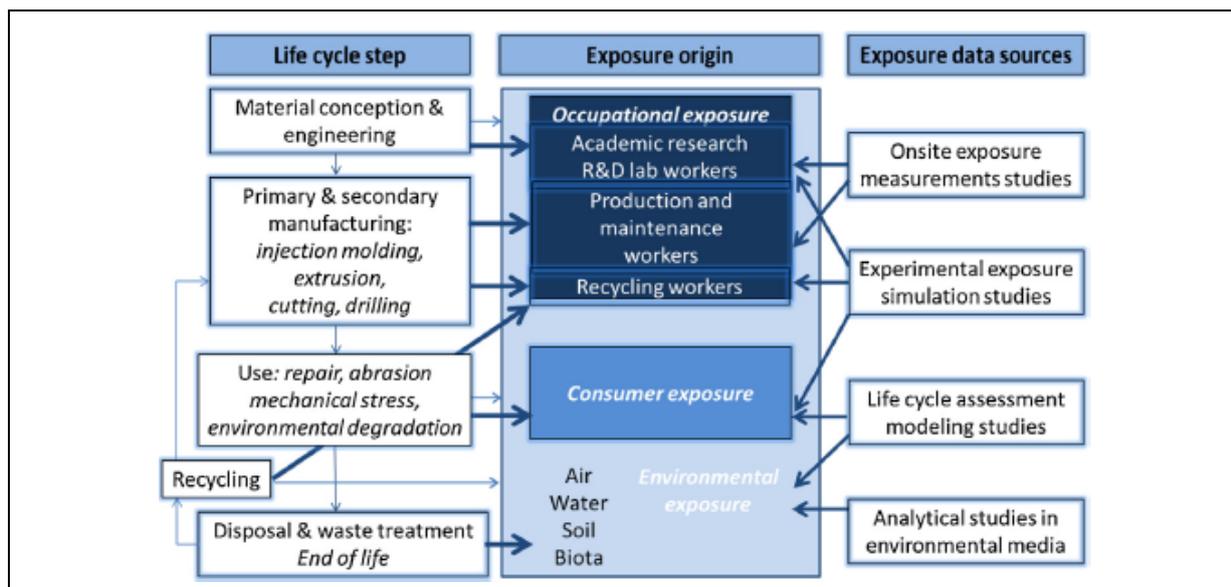
[VANCE et al \(2015\)](#) reanalisaram o **inventário de produtos nanotecnológicos** atualizado até março de 2015 (1814 produtos; 622 empresas; 32 países), e incluíram descritores (características) de relevância toxicológica, como composição e vias potenciais de exposição; destaca-se que há nanomaterial que apresenta ferro ou manganês em sua composição, que a maioria dos nanomateriais metálicos se apresenta suspenso em fluido, e que a via inalatória é quantitativamente relevante (**Figura 6**). Como o consumo exigirá a fabricação desses produtos e como sua utilização dependerá da aplicação, os cenários esperados serão de exposição: ocupacional crônica; por consumo esporádico (aguda); ou por consumo continuado (crônica) [\(SINGH et al, 2009\)](#). Daí a importância de que se dê atenção especial à possibilidade de exposição durante todo o ciclo de vida do nanomaterial (da fabricação até o descarte ou eliminação; **Figura 7**), a fim de que se possa identificar os riscos de exposição [\(SAVOLAINEN et al, 2010; CANU et al, 2016\)](#).

**Figura 6.** Inventário de produtos nanotecnológicos (atualizado até março de 2015). **(A)** Matriz de composição química. **(B)** Principais vias de exposição. **(C)** Principais formas de apresentação na comercialização.

Fonte: [VANCE et al \(2015\)](#).

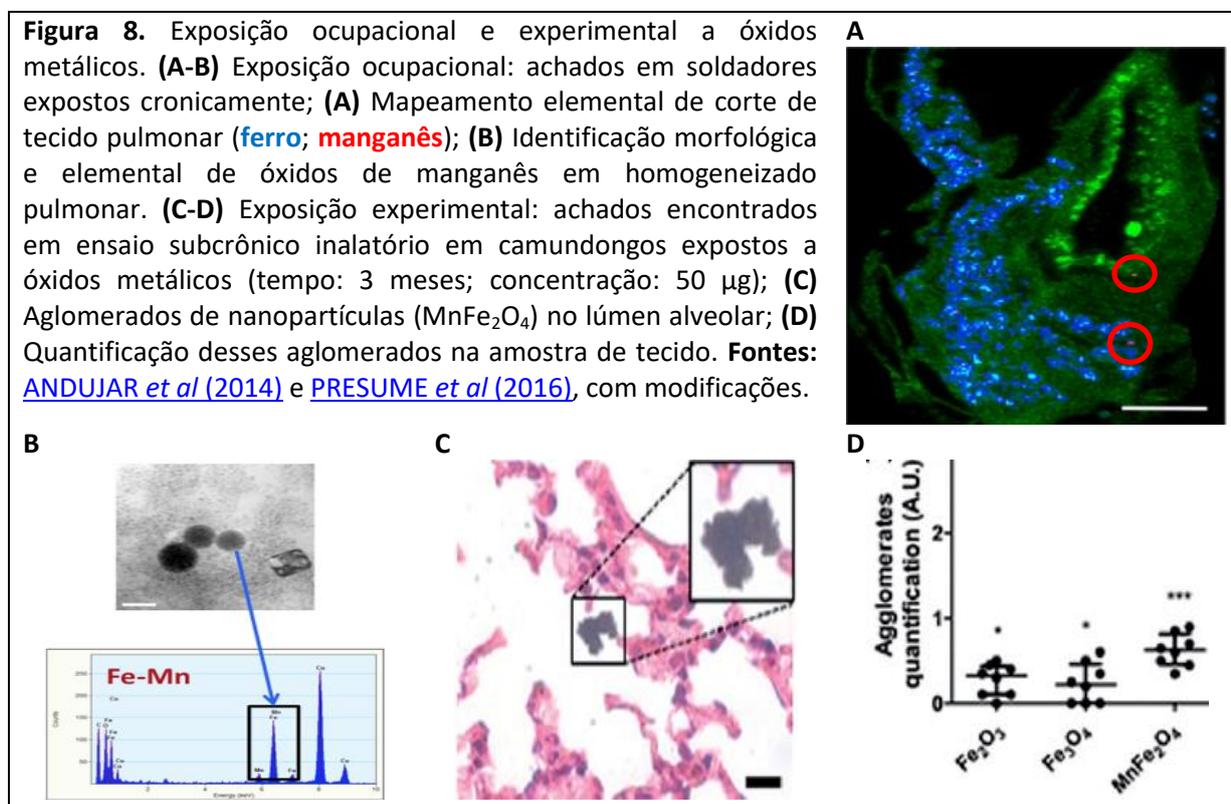


No contexto **ocupacional**, [PRESUME et al \(2016\)](#) identificaram óxidos metálicos em macrófagos infiltrados em região fibrosa no pulmão de soldadores (**Figura 8**); quando concentrações representativas desse cenário foram subcronicamente administradas em camundongos (3 meses), as nanopartículas de ferrita de manganês ( $MnFe_2O_4$ ) causaram fibrose peribronquiolar moderada, enquanto as de maguemita ( $Fe_2O_3$ ) causaram fibrose peribronquiolar, perivascular e alveolar, juntamente com inflamação intersticial (indicativo de translocação). Anteriormente, [ANDUJAR et al \(2014\)](#) detectaram esses óxidos no pulmão de soldadores e que esses nanomateriais induziram secretoma pró-inflamatório e a migração de macrófagos em cultivo celular (**Figura 8**). Igualmente, [YADAV et al \(2001\)](#) já haviam comprovado em estudo observacional de soldadores que a exposição a gases e matéria particulada complexa (que poderiam conter ferrita de manganês e óxidos de ferro) causou dano cromossômico considerável em linfócitos amostrados dessa população.

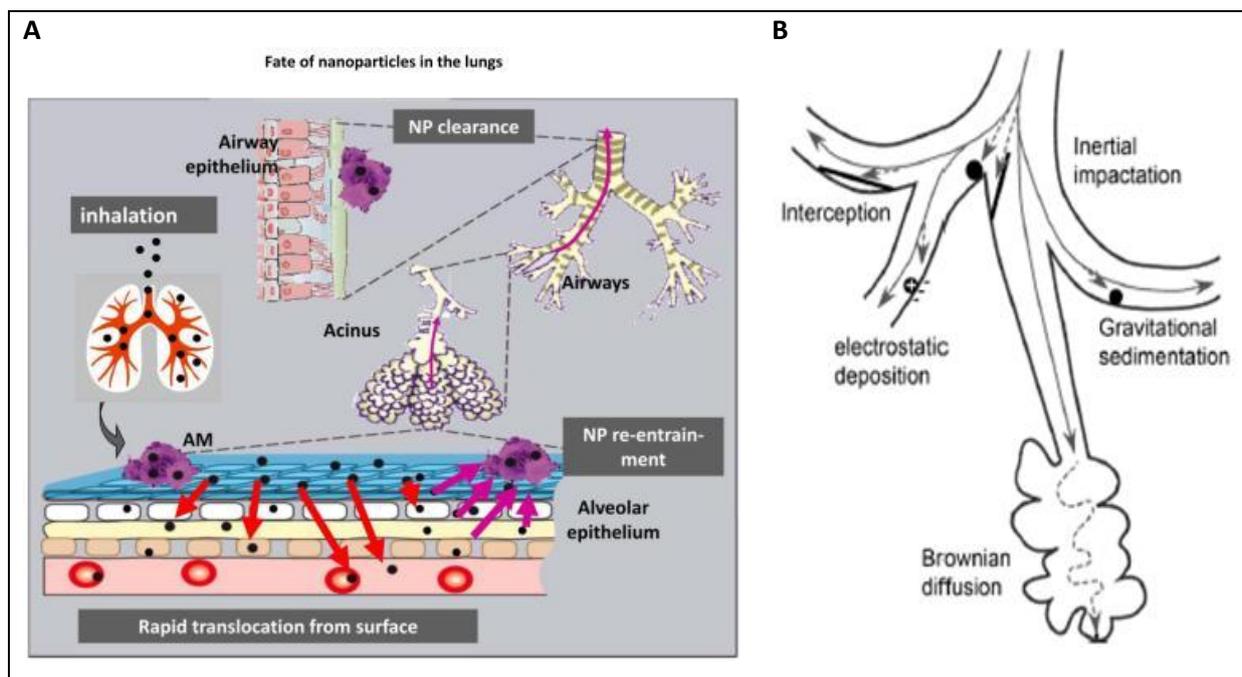


**Figura 7.** Fases potenciais do ciclo de vida de um nanomaterial e a identificação de possíveis perigos, eventos de risco e vias de exposição. **Fonte:** [CANU et al \(2016\)](#).

Ressalte-se que ferrita de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) já são produzidas e comercializadas por vários fornecedores: CAS# 1344-43-0 = [US Research Nanomaterials](#); CAS# 12063-10-4 = [American Elements](#), [Sigma-Aldrich](#), [Nano Research Lab](#), [Alfa Chemistry](#), [1717 Chemall Corporation](#), [MuseChem](#), [Nanjing Emperor Nano Materials Co](#). Portanto, o risco ocupacional existe e exige o estudo toxicológico em modelo compatível com esse cenário (**Figura 9**).



A preocupação com os efeitos da sobrecarga de metais no compartimento celular é antiga (ferro e manganês, no caso).



**Figura 9.** Deposição e translocação de nanopartículas no trato respiratório. **(A)** Modelo de deposição difusional em todo o trato. **(B)** Mecanismos de deposição conforme o segmento do trato. **Fontes:** [KREYLING et al \(2013\)](#) e [FRÖHLICH & SALAR-BEHZADI \(2014\)](#).

O **ferro** há tempos é associado ao câncer ([STEVENS et al, 1988](#); [NELSON, 2001](#); [HUANG, 2003](#); [ROCKFIELD et al, 2017](#)) e há estratégias terapêuticas antineoplásicas por sua quelação ([KALINOWSKI & RICHARDSON, 2005](#); [MOUSSA et al, 2018](#)), promoção de ferroptose ([ALVAREZ & POSSEMATO, 2018](#)) ou exploração de seu efeito oxidativo tardio ([XU et al, 2017](#)). Segundo [SINGH et al \(2009\)](#), o ferro liberado de óxidos metálicos age por inúmeras vias, tanto indiretas (produção de radicais livres e lipoperoxidação oxidativa) quanto diretas (dano do material genético e de proteínas); pressupõem que a internalização celular de óxidos férricos, atrelada à remoção ou degradação da cobertura, poderá causar sobrecarga de nanopartículas (e de ferro), sendo um fator de risco.

A exposição ao **manganês** é associada à mutagenicidade e carcinogenicidade ([BEVAN et al, 2017](#)). De acordo com [BECKMAN et al \(1985\)](#),  $Mn^{2+}$  pode causar erro na incorporação de bases, devido a sua ligação à fita simples durante a replicação, ou por interação com a polimerase I; [MEO et al \(1991\)](#) indicaram que a decomposição de sais de manganês em condições ácidas favoreceria a conversão a  $Mn^{2+}$ , um conhecido agente com ação mutagênica (positivo no teste de Ames), danificadora do ácido desoxirribonucleico (ensaio do cometa), e potencialmente carcinogênico; [KAUR et al \(2017\)](#) apontaram que a sobrecarga

de manganês (em modelo bacteriano – *Escherichia coli*) causou a depleção de ferro, o que interferiu na funcionalidade de metaloenzimas férricas, concorrentemente à interferência na respiração celular, de modo a ter reduzido a proliferação e a manutenção da integridade de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleares; [TARALE et al \(2017\)](#) relataram que  $Mn^{2+}$  alterou a metilação dos genes  $PINK_1$ – $PARK_2$  e causou disfunção mitocondrial; [STEPHENSON et al \(2013\)](#) descreveram dano oxidativo molecular (oxidação da timina) causado por íons  $Mn^{2+}$ , efeito que foi mitigado pelo tratamento com glutatona e N-acetilcisteína; o elemento, absorvido na forma ionizada e transportado pela transferrina, uma vez dentro célula, seria predominantemente encontrado na mitocôndria e núcleo; [ZAKHARCHEVA et al \(2017\)](#) demonstraram que células de câncer ovariano com capacidade aumentada de reparação do ácido desoxirribonucleico seriam resistentes a concentrações tóxicas de  $Mn^{2+}$ ; por fim, [ALIMBA et al \(2016\)](#) reportaram que o tratamento de células linfoblastoides com  $Mn^{2+}$  causou o aumento do efeito genotóxico cromossomal (micronucleação) e da inibição da proliferação celular com relação concentração-resposta linear.

Um campo específico da nanotoxicologia é a **Nanogenotoxicologia**. A importância da área é exemplificada pelo conhecimento de que várias substâncias danificam e alteram o material genético ou seu funcionamento e sua expressão; são eventos genotóxicos e mutagênicos que promovem ou iniciam a carcinogênese ([SINGH et al, 2009](#); [LOUREIRO et al, 2015](#)). Como reiterado por [DOAK et al \(2017\)](#), a avaliação de risco dos nanomateriais busca estabelecer a potencialidade deles induzirem dano ao material genético (genotoxicidade, mutações genéticas e aberrações cromossômicas), e, subsequentemente, a iniciação da formação de um tumor (carcinogênese); a instabilidade genética envolvendo o acúmulo de tais eventos está intimamente associada à carcinogênese e já foi detectada em todas as malignidades; o câncer é um fenótipo que resulta da acumulação de múltiplos eventos que conduzem à formação de um tumor de forma progressiva e em múltiplas etapas (**Figura 10**). Vários artigos já revisaram o assunto, a terminologia básica de (geno)toxicologia, os mecanismos de genotoxicidade, os ensaios e parâmetros mais usados e o quadro da genotoxicidade de nanomateriais ([GONZALEZ et al, 2008](#); [LANDSIEDEL et al, 2009](#); [SINGH et al, 2009](#); [RIM et al, 2013](#); [MAGDOLENOVA et al, 2014](#); [KUMAR et al, 2014](#); [GOLBAMAKI et al, 2015](#); [DOAK & DUSINSKA, 2016](#)).

O potencial genotóxico dos nanomateriais já havia sido demonstrado pela interação inespecífica de nanopartículas de ouro com fitas duplas de ácido desoxirribonucleico, na

ausência de bases expostas [SANDSTRÖM et al \(2003\)](#); também foi comprovado *in vivo* por [LI et al \(2010\)](#) que a anatase (TiO<sub>2</sub>) poderia se inserir nas bases de ácido desoxirribonucleico, se ligar a nucleotídeos, e alterar sua estrutura molecular secundária em hepatócitos; e a literatura indica que os nanotubos de carbono são genotóxicos e carcinogênicos ([SAVOLAINEN et al, 2010](#)).

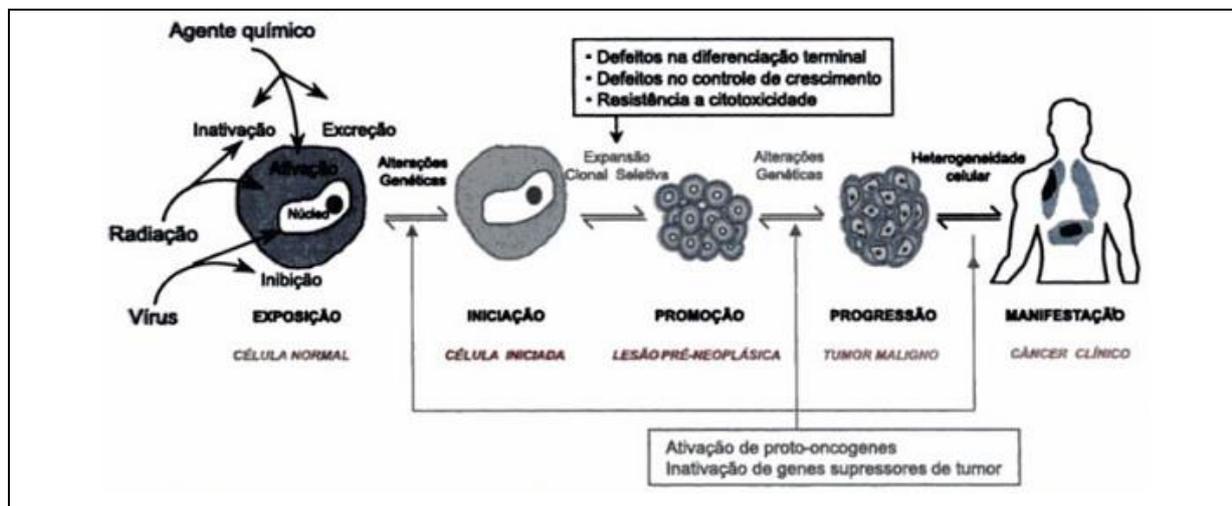
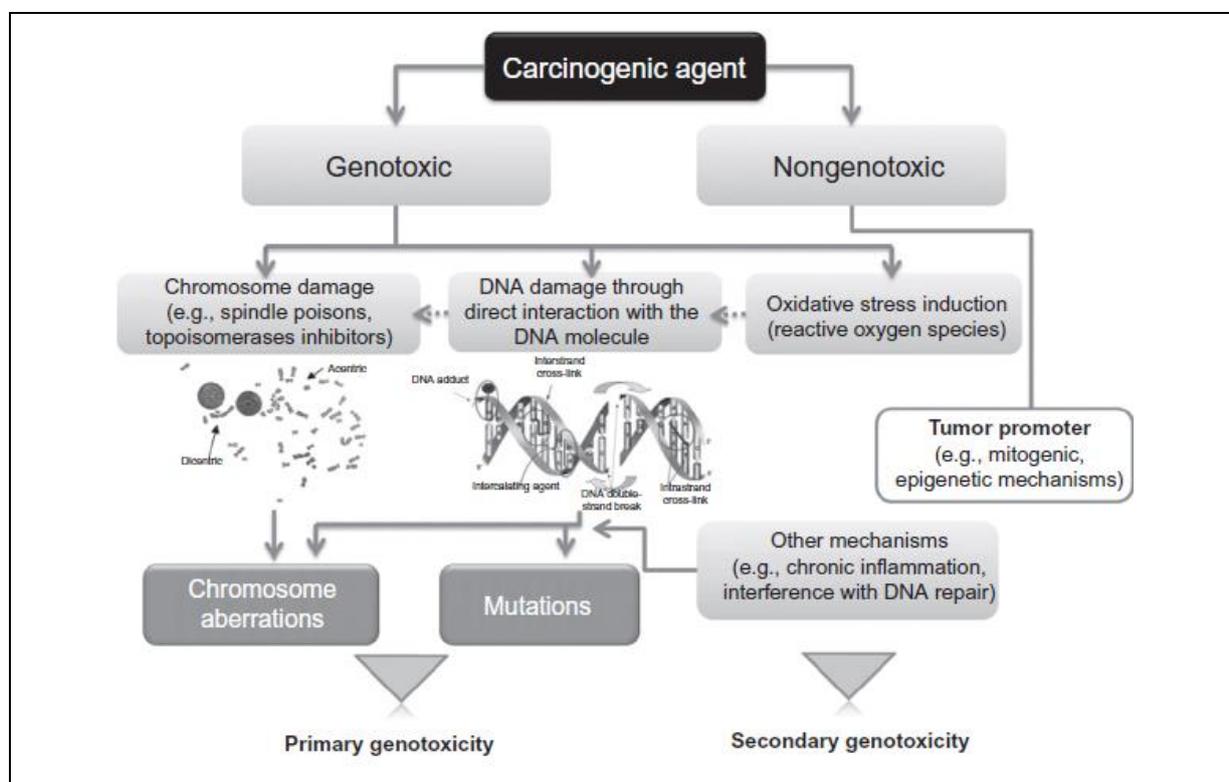


Figura 10. Carcinogênese segundo a teoria das múltiplas etapas. Fonte: [RIBEIRO et al \(2003\)](#).

No campo regulatório, a **Genotoxicologia** estuda a carcinogênese genotóxica (**Figura 11**), ou a associação entre exposição e danos ao material genético (ácido desoxirribonucleico e cromossomos), segundo mecanismos classificados como: (1) **primários diretos**, por contato com o ácido desoxirribonucleico, durante a intérfase (replicação, transcrição, reparação e intercalação) ou a mitose (clastogenia ou aneuploidia); (2) **primários indiretos**, por contato ou interferência do nanomaterial ou por ação de radicais livres em outras biomoléculas e substratos da intérfase (replicação, transcrição, reparação, regulação do ciclo celular) ou da mitose (centríolo, quinetocoro, microtúbulos, proteínas do eixo mitótico); ou (3) **secundários**, por ação inflamatória e que não requer internalização (somente em modelos *in vivo* ou em cocultivo). Um nanomaterial será classificado, de acordo com o seu efeito, como: (i) **genotóxico** – quando danificar ou interferir na integridade ou na funcionalidade do material genético, como fragmentação cromossômica ou do ácido desoxirribonucleico, formação de adutos por oxidação, mutações, recombinações, ligações cruzadas entre as fitas, entre outros; ou (ii) **não-genotóxico** – quando seu mecanismo não implicar em tais danos ou disfunções do material genético ([THYBAUD et al, 2007](#); [SINGH et al, 2009](#); [LOUREIRO et al, 2015](#); [GUÉRARD et al, 2015](#); [EVANS et al, 2016](#)).

Apesar de não haver critérios prefixados, o [NANOGENOTOX \(2013\)](#) classificou como resultado **positivo** para genotoxicidade o aumento estatisticamente significativo do efeito em pelo menos 2 grupos tratados ou na maior concentração, acompanhado de relação concentração-resposta linear. Em todo o caso, há a exigência de se comprovar se houve a internalização do nanomaterial, para que se possa categorizar o mecanismo de ação (primário ou secundário) e avaliar a relevância do efeito observado; na invidência, um resultado **negativo** poderá ser falso devido à falta de exposição e a não-genotoxicidade não poderá ser excluída, exceto se se tratar de um modelo experimental complexo no qual possa ocorrer mecanismo genotóxico secundário (*in vivo* ou cocultivo) ([NANOGENOTOX, 2013](#); [HUK et al, 2014](#)); [MAGDOLENOVA et al, 2014](#); [GUÉRARD et al, 2015](#); [DUSINSKA et al, 2015](#)).



**Figura 11.** Mecanismos e vias de ação de agentes genotóxicos e não-genotóxicos associados à carcinogênese. **Fonte:** [LOUREIRO et al \(2015\)](#).

Esclarecidos os fundamentos da (nano)genotoxicologia, agora se tratará dos ensaios conduzidos nesta pesquisa. Tradicionalmente, a **bateria de estudos** para substâncias moleculares e solúveis é delineada para identificar mecanismos representativos de eventos críticos no processo carcinogênico: mutação genética e aberração cromossômica – mormente a clastogênese (estrutural, com perda por fragmentação) e a aneuploidia (numérica, com perda sem fragmentação) ([KIRKLAND et al, 2011](#); [LOUREIRO et al, 2015](#); [DUSINSKA et al, 2015](#)).

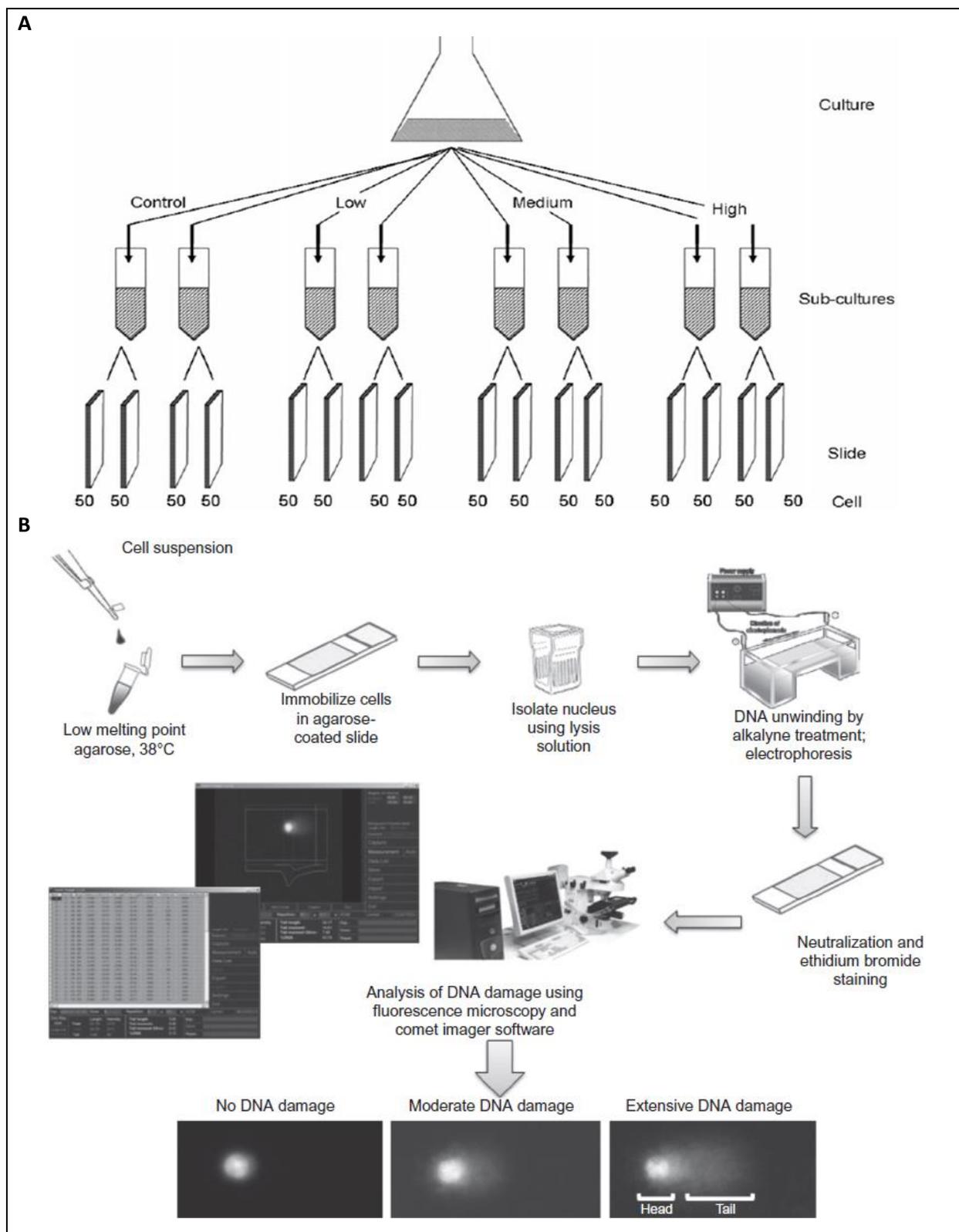
Os métodos *in vitro* e em etapas podem substituir os *in vivo* como preditores de risco da carcinogênese genotóxica, pois podem isolar os mecanismos e vias de ação e elucidar relações concentração-resposta não lineares e efeitos em regimes de baixa dosimetria; e isso desde que sejam ajustados para se testar nanomateriais ([STONE et al, 2009](#); [GUÉRARD et al, 2015](#); [LOUREIRO et al, 2015](#)). Os métodos *in vivo* podem ser proibidos e inadequados para discriminação, pois o mecanismo secundário prevalece nesses modelos ([EVANS et al, 2016](#)); assim, devem ser executados quando os resultados forem claramente positivos, para se encorpar o peso das evidências, escrutinizar o modo de ação (se for mormente indireto ou secundário) e a relevância para a exposição humana, e determinar o risco e sua extrapolação para humanos ([GUÉRARD et al, 2015](#); [THYBAUD et al, 2007](#); [MARTUS et al, 2015](#)).

#### 1.2.1. Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa)

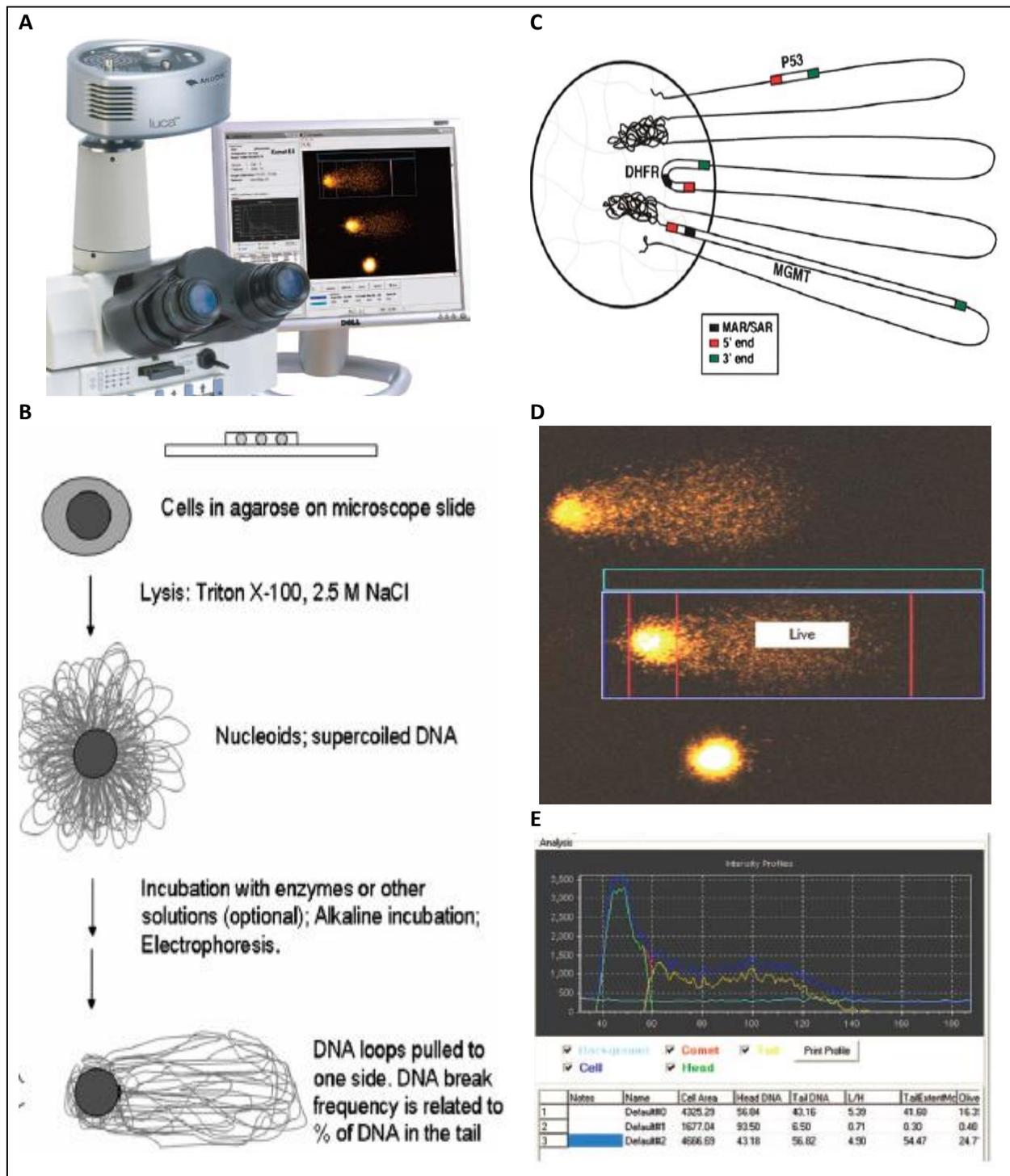
O método clássico para a verificação de mutação genética é o **teste de Ames** ([THYBAUD et al, 2007](#); [KIRKLAND et al, 2011](#)). Entretanto, há relatos da inadequação do modelo procarioto (bactéria); a parede celular dificultaria ou impediria a internalização de nanomateriais insolúveis e renderia resultados falso negativos com alta frequência ([LANDSIEDEL et al, 2009](#); [WOODRUFF et al, 2012](#); [RASMUSSEN et al, 2016](#)). Outro método usado é o **ensaio do cometa**. O seu princípio é: o aumento da danificação aumentará a frequência da sua reparação e o risco de mutação e incompletudes; logo, é marcador potencial de mutação, de sua fixação e de instabilidade genética, todas associadas à carcinogênese ([COLLINS et al, 1997<sup>1</sup>](#); [STONE et al, 2009](#); [KARLSSON, 2010](#); [AZQUETA et al, 2014](#) e [EL YAMANI et al, 2016](#)).

O **delineamento experimental *in vitro*** é hierárquico; cada nível de mensuração (de variação) está hierarquica e ascendentemente contido em outro que lhe ascende [1º(cultivo ou garrafa) ⊃ 2º(subcultivo ou poço ou unidade experimental ou replicata biológica) ⊃ 3º(lâmina ou gel ou replicata técnica) ⊃ 4º(célula)]; (**Figura 12**). Enquanto o poço (subcultivo) é a unidade experimental (de tratamento), duas subpopulações de células são independentemente amostradas dele (replicatas técnicas), acamadas na respectiva lâmina e submetidas à eletroforese; uma amostra de 50 células de cada subpopulação é então analisada em sistema semi-automatizado; a intensidade do ácido desoxirribonucleico na cauda de cada cometa é sumarizada estatisticamente (média) em cada lâmina, e essa é

consecutivamente sumarizada estatisticamente (média) em cada poço, e assim por diante, ascendente (Figura 13).



**Figura 12.** Delineamento hierárquico e fluxo experimentais do ensaio do cometa. **(A)** Delineamento experimental hierárquico ou em múltiplos níveis (cultivo  $\rightarrow$  subcultivo  $\rightarrow$  lâmina  $\rightarrow$  célula). **(B)** Fluxo experimental geral da versão alcalina do ensaio. **Fontes:** [LOVELL & OMORI \(2008\)](#) e [LOUREIRO et al \(2015\)](#).



**Figura 13.** Sistema semi-automatizado de análise digitalizada no ensaio do cometa, modelo de formação da cauda e mensuração da intensidade da cauda. **(A)** Sistema Komet 5. **(B)** A lise em alta osmolaridade salina e com surfactante remove as moléculas solúveis, e as quebras e os locais lábeis ou de reparação convertidos em quebras no meio alcalino relaxam as alças de ácido desoxirribonucleico do nucleóide, as quais migram em direção ao anodo durante a eletroforese, para formar a cauda do cometa (relaxamento e migração). **(C)** Regiões genômicas permanecem associadas à matriz nuclear (MAR/SAR), e, juntamente com ela, constituem a cabeça do cometa. **(D)** A forma do cometa de 3 nucleóides marcados com brometo de etídio é transformada em intensidade relativa ou quantidade de ácido desoxirribonucleico (cabeça + cauda = 100%). **(E)** Perfil de intensidade (em unidades arbitrárias): do fundo do campo, da célula, do cometa, da cabeça do cometa e da cauda do cometa. Fontes: [SHAPOSHNIKOV et al \(2009\)](#) e [ANDOR TECHNOLOGIES \(2016\)](#).

A **versão alcalina** do ensaio foi desenvolvida por [RYDBERG & JOHANSON \(1978\)](#); foi aperfeiçoada por [OSTLING & JOHANSON \(1984\)](#), com a finalidade de se quantificar as quebras totais do ácido desoxirribonucleico (simples – de uma das fitas, e, duplas – das duas fitas) e prever a efetividade da radioterapia, pelo acompanhamento da cinética de reparação em cultivo de linfoma murino (L5178Y-S) tratado com radiação gama; foi novamente aprimorada por [SINGH \*et al\* \(1988\)](#), os quais já reconheciam sua relevância na toxicologia ambiental e no estudo da carcinogênese, e com o fito de avaliar a cinética de reparação em linfócitos humanos expostos a raios-X. As premissas das melhorias técnicas postuladas pelos autores seriam – (i) aumento do relaxamento do enovelamento das alças nos locais lisados pela radiação (quebras) e pela excisão de bases ou nucleotídeos (reparos); (ii) facilitação da migração dessas alças afrouxadas; (iii) aumento da representatividade da cauda do cometa em direção ao anodo eletroforético (quebras simples e duplas + locais abásicos lábeis convertidos em quebras em meio alcalino); e (iv) aumento da sensibilidade do ensaio –; também analisaram os fatores que influenciaram a sensibilidade e concluíram que a concentração de agarose na lâmina e o estado da integridade celular seriam determinantes.

O estudo da **cinética de reparação** dos danos demonstrou que as quebras simples são quantitativamente maiores que as duplas e que o processo é temporalmente bimodal em células normais, proficientes e aptas: primeiramente reparam-se as quebras simples, cujo meio-tempo é de poucos minutos; depois as quebras duplas, com meio-tempo superior a 60 minutos ([COLLINS \*et al\*, 1995](#)). Também recomendaram que, na evidência de dano oxidativo, muito comum na presença de íons divalentes de metais de transição, a adição de endonucleases específicas antes do desenovelamento aumentaria a sensibilidade do ensaio e permitiria quantificar a extensão do dano oxidativo reparado e não reparado; esse último poderia ser um marcador de deficiência da aptidão celular e de risco à estabilidade genética.

Ainda segundo [COLLINS \*et al\* \(1997<sup>2</sup>\)](#) e [HUK \*et al\* \(2014\)](#), a **validação** de um protocolo pressupõe a utilização de padrões (grupo controle negativo, para verificar a intensidade basal do dano na linhagem; grupo controle positivo, para avaliar a execução do procedimento) e a análise de sua confiabilidade (replicação, determinando-se a variação intracasos pelo coeficiente de variação) e de sua reprodutibilidade (repetição, determinando-se a variação intercasos pela regressão linear).

Posteriormente, [AZQUETA et al \(2011\)](#) e [ERSSON & MÖLLER \(2011\)](#) revisaram os procedimentos técnicos da eletroforese que poderiam ser fonte significativa de variação experimental. São **fatores críticos**: a concentração da agarose, o tempo de desenovelamento em meio alcalino, a voltagem da corrente elétrica e o tempo de eletroforese. A tensão da corrente elétrica não foi significativa, pois é inversamente proporcional à voltagem, a qual é o parâmetro correto de balizamento. Ressaltaram também que essas variáveis devem ser experimentalmente parametrizadas para cada tipo celular e variam conforme a proficiência laboratorial, o que dificulta a comparação de estudos.

As (des)vantagens desse método foram descritas em [COLLINS et al, 1997<sup>1</sup>](#); [COLLINS et al, 1997<sup>2</sup>](#); [STONE et al, 2009](#); [SHAPOSHNIKOV et al, 2009](#); [AZQUETA & COLLINS, 2013](#); [CATALÁN et al, 2014](#); [AZQUETA & DUSINSKA, 2015](#); [COWIE et al, 2015](#); [KARLSSON et al, 2015](#); e [KOPPEN et al, 2017](#).

Suas **vantagens** são: simplicidade, economicidade, automação, escalabilidade, robustez, sensibilidade (detecção de agentes genotóxicos de baixa potência), versatilidade (qualquer célula eucariótica, proliferativas ou não, aderentes ou não, e de qualquer tecido, e para várias finalidades e campos de investigação), amplitude (detecta uma gama de danos - quebras simples e duplas, locais de excisão incompleta, ligações cruzadas, locais lábeis a alcalinidade e abásicos, alquilação, e lesões oxidativas, se empregadas endonucleases), comparabilidade (se usada a métrica da intensidade da cauda, a qual tem relação linear com o número de quebras, e que pode ser nesse convertida por meio de curva de calibração), não detecta o ácido desoxirribonucleico mitocondrial (não ligado á matriz nuclear), está previsto nos documentos de orientação do REACH (*Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals*), adaptabilidade para aplicação em nanomateriais e é o ensaio mais usado em nanogenotoxicologia.

Já as suas **desvantagens** são: baixa reprodutibilidade em tempos distintos (em estudos observacionais); e a interpretação dos achados não é direta em delineamentos mais simples, sem inclusão de endonucleases (quantitativamente, implicaria menor especificidade) ou sem avaliação cinética (qualitativamente, implicaria em indiscriminação do tipo de dano), porque as quebras (originárias ou por conversão) são transientes e rapidamente reparadas (não fixadas), e não se distinguirá se uma cauda significativa reflete mais a ocorrência de dano (efeito deletério) ou a sua reparação (efeito benéfico e revelador de aptidão).

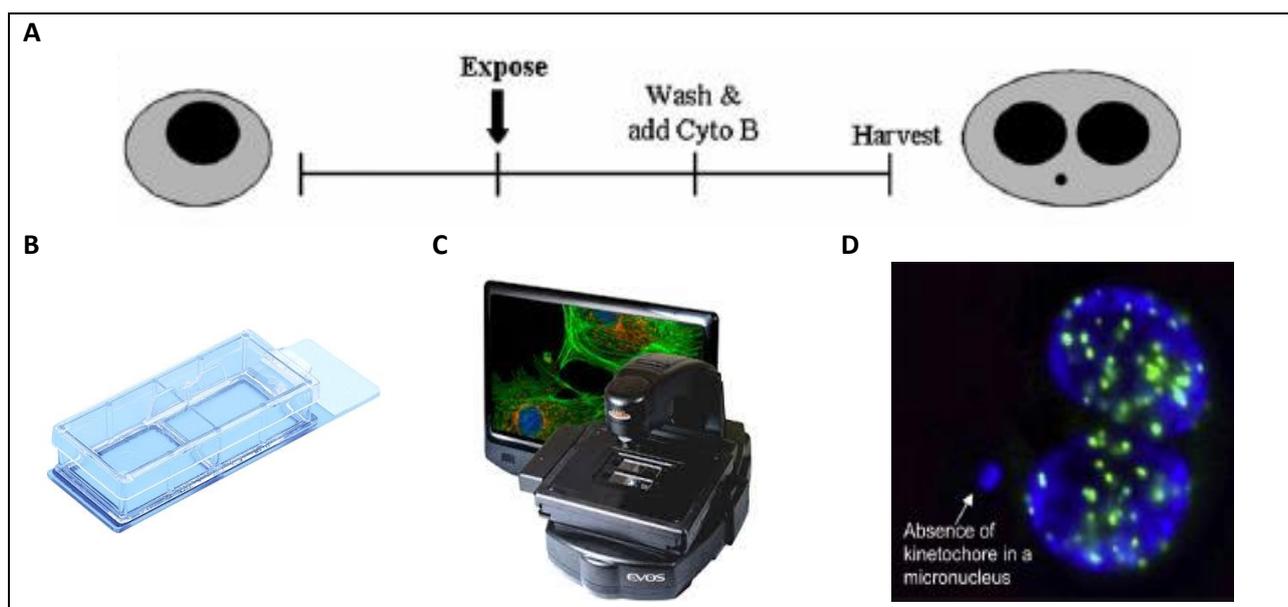
A sua **aplicabilidade** na avaliação de risco de nanomateriais foi especificamente revisada por [KARLSSON \(2010\)](#), [KARLSSON et al \(2015\)](#), [DUSINSKA et al \(2015\)](#) e [COLLINS et al \(2017\)](#). De acordo com os segundos, o índice de correlação entre os resultados positivos para parâmetros distintos (ensaio do cometa e teste do micronúcleo), verificada para vários nanomateriais, indica sua aplicabilidade. Entretanto, deve ser dar atenção ao cabimento das **recomendações** relatadas por vários grupos. A estratégia em etapas pressupõe o estabelecimento do regime de tratamento (concentração e tempo) a partir de ensaios de citotoxicidade ou de viabilidade, que também podem indicar parâmetros cinéticos. A dosimetria deverá garantir a viabilidade celular adequada, que não cause saturação na leitura ou viés de resultado falso positivo por danificação apoptótica ou necrótica do material genético ([STONE et al, 2009](#); [CATALÁN et al, 2014](#); [HUK et al, 2014](#); [COWIE et al, 2015](#); [DUSINSKA et al, 2015](#); [GUÉRARD et al, 2015](#); [KOPPEN et al, 2017](#)). O tempo de exposição deverá ser adequado à solubilidade do nanomaterial, e deverá ser prolongado, para, pelo menos, 24 horas, para garantir a possibilidade de internalização do nanomaterial e a avaliação de mecanismo primário de lesão e da cinética de sua recuperação ([STONE et al, 2009](#); [HUK et al, 2014](#); [DUSINSKA et al, 2015](#)). A presença de nanopartículas no gel após a lise poderá potencializar o dano e causar falso positivo ([STONE et al, 2009](#); [COWIE et al, 2015](#)), especificamente se o nanomaterial for fotocatalítico ([Di BUCCHIANICO et al, 2016](#)). Sua remanescência poderá interferir na intensidade relativa se for autofluorescente (falso positivo) ou se recobrir o cometa e prejudicar a fluorescência (falso negativo), ou na sua migração (falso negativo) ([STONE et al, 2009](#); [KARLSSON, 2010](#); [KARLSSON et al, 2015](#)).

#### 1.2.2. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Um dos métodos clássicos para a detecção de potenciais eventos cromossômicos (**clastogenia e aneuploidia**) é o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (**Figura 14**). Seu princípio é: após a exposição a um agente genotóxico, os danos clastogênicos do ácido desoxirribonucleico (quebras, locais abásicos ou lábeis, locais de excisão, ente outros), que não são reparados ou que são incorretamente reparados, além dos danos aneugênicos, pelos quais cromossomos tem sua estrutura modificada (aberração) ou que não se segregam corretamente para o núcleo da célula filha durante a anáfase, todos conduzem a formação de micronúcleos (micronucleação). Ao contrário do ensaio do cometa, que detecta danos transientes e potencialmente reparáveis, o micronúcleo formado no teste com bloqueio da

citocinese é um marcador de danos irreversíveis e que se tornaram fixados ao material genético (fixação); portanto, a sua identificação, mesmo após um curto período de exposição, tem maior relevância toxicológica ([NANOGENOTOX, 2013](#)); e sua confirmação, concorrentemente à detecção de efeito significativo e persistente no ensaio do cometa, é e maior peso e é relevante no aspecto de mecanismo de ação.

O **delineamento experimental *in vitro*** também é hierárquico, mas menos complexo, uma vez que apenas existem 3 níveis [1º(cultivo ou garrafa)  $\supset$  2º(subcultivo ou câmara ou unidade experimental ou replicata biológica)  $\supset$  3º(célula)]. Enquanto a câmara (subcultivo) é a unidade experimental (de tratamento), apenas uma amostra de  $10^3$  células binucleadas de cada uma das 2 câmaras é aleatoriamente selecionada e analisada para micronucleação, e outra de  $10^2$  para o índice de proliferação; a frequência de micronucleação de cada câmara é somada (lâmina ou grupo =  $2 \cdot 10^3$  células); o número de núcleos de cada célula (mono, bi ou multinucleada) é representado como índice de proliferação celular (**Figura 14**).



**Figura 14.** Delineamento hierárquico e fluxo experimentais do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. **(A)** Método de cotratamento tardio com bloqueador da citocinese: a citocalasina B é adicionada ao meio de cultivo 6 horas após o início do tratamento com o nanomaterial, e a lâmina é coletada quando forem completadas 48 horas de tratamento (42 horas após a adição do bloqueador). **(B)** Sistema Chamber Slide (C6682-1PAK), para cultivo celular em replicata, processamento da lâmina e marcação com fluoróforo. **(C)** Sistema EVOS flAuto para microscopia de fluorescência e multicanal. **(D)** Microscopia de fluorescência de célula binucleada com filtros para 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI \_ ligante específico para ácido desoxirribonucleico) e proteína verde fluorescente (GFP \_ coloração imunofluorescente para proteínas do quinetocoro): as imagens sobrepostas indicam efeito clastogênico, uma vez que no micronúcleo não há marcação para quinetocoro (o micronúcleo é formado apenas por fragmentos cromossômicos); aumento 60x. **Fontes:** [SIGMA-ALDRICH \(2018\)](#), [THERMO FISHER SCIENTIFIC \(2018\)](#), [SINGH et al \(2012\)](#) e [DOAK et al \(2009\)](#) - com modificações.

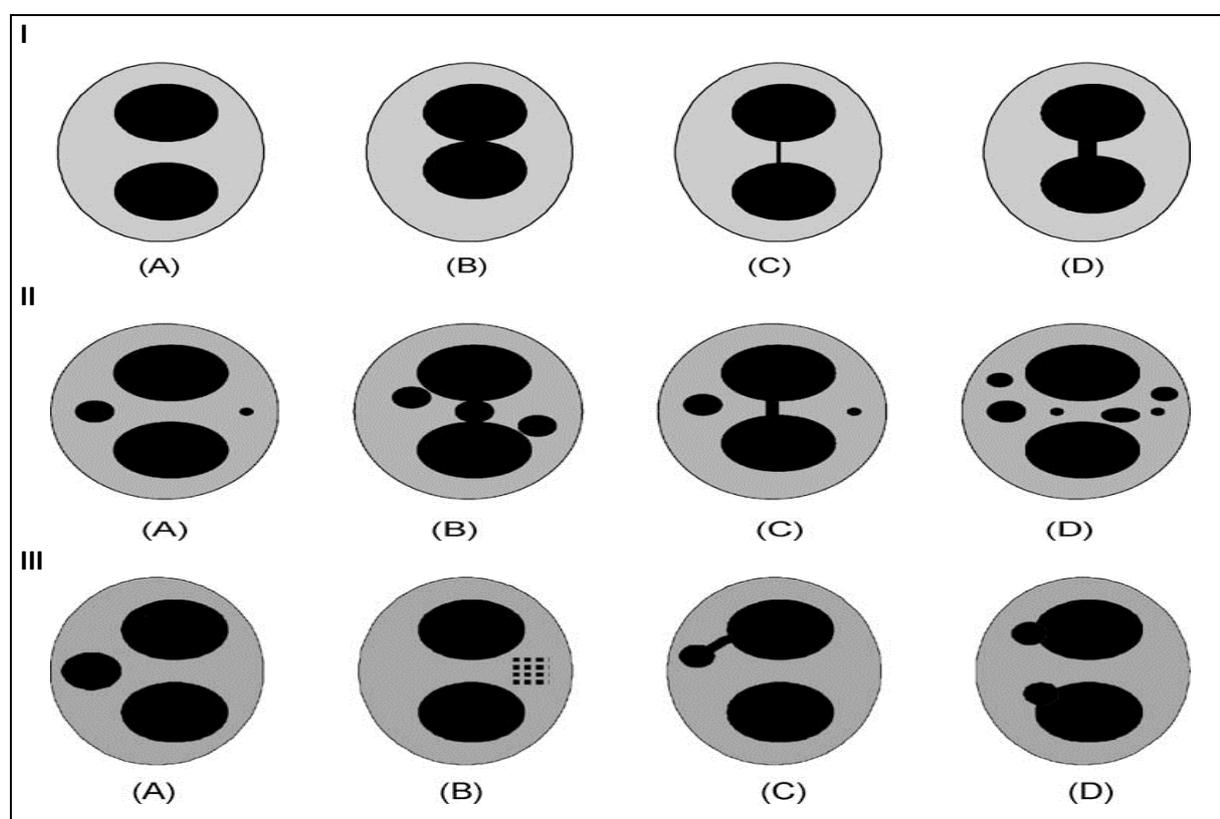
A **importância** do teste reside no fato de que o dano ao ácido desoxirribonucleico pode ser representado por mutações cromossômicas, que são eventos associados à carcinogênese ([FENECH, 2000](#)). A micronucleação também foi recentemente relacionada à cromotripsia, fenômeno de mutação em casos de câncer e aberrações congênitas, pelo qual cromossomos não segregados sofrem fragmentações e extensos rearranjos ([ZHANG \*et al.\*, 2015](#)).

A **versão de bloqueio da citocinese** do teste foi inaugurada por [FENECH & MORLEY \(1985\)](#), que estudavam a frequência de micronúcleos em linfócitos irradiados. A premissa do bloqueio era: como linfócitos cultivados precisariam ser estimulados por mitógeno e então passar por pelo menos um ciclo celular completo para que o dano cromossomal se revelasse morfológicamente, os resultados dificilmente eram reprodutíveis (por causa de duas dependências hierarquizadas - da proporção de células que responderiam à mitogênese, e, dessas, as que se dividiriam ao menos uma vez); bloqueando a citocinese, essas células que passaram pela mitose seriam prontas e morfológicamente distinguíveis, pois seriam binucleadas; o ensaio também detectou relação concentração-resposta linear a radiação, juntamente com a ausência de efeito causado somente pela citocalasina B; outra vantagem seria o fato da técnica gerar resultados quantitativos e comparáveis entre experimentos. Então, se deu proveito a estudos como o de [CARTER \(1967\)](#), que já tinha verificado que a citocalasina B, um macrolídeo obtido do metabolismo de fungos, permitiria que células de mamíferos em cultivo completassem a divisão celular, mas sem prejuízo à divisão nuclear e à viabilidade celular; na verdade, o ciclo celular progrediria e a cada divisão nuclear o número de núcleos duplicaria; o que também se observou foi o aumento da aderência ao substrato e a redução da motilidade, implicando um mecanismo de ação estrutural. Posteriormente, foi identificado que o mecanismo de ação da citocalasina B era o bloqueio da polimerização da actina ([MACLEAN-FLETCHER & POLLARD, 1980](#)).

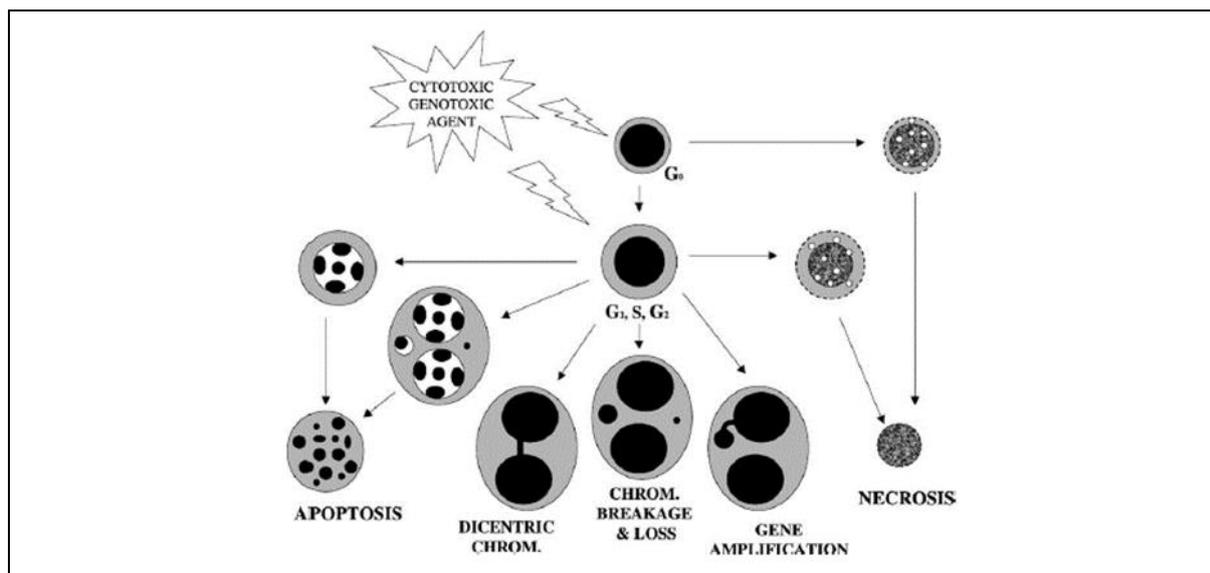
Também os **critérios** para a identificação e a contagem de micronúcleos pelo método de bloqueio foram padronizados ([FENECH \*et al.\*, 2003](#)) e são amplamente aceitos (**Figura 15**).

Quando o método já era aplicado no campo da genotoxicidade, [FENECH \(1993\)](#), [NORRPA & FALCK \(2003\)](#) e [FENECH \*et al.\* \(2011\)](#) relacionaram que a **micronucleação** se originaria na anáfase, a partir de cromossomos acêntricos e fragmentos de cromátides retardatários, por causa de erro de reparo ou de não reparação de quebras do ácido desoxirribonucleico (efeito estrutural - clastogênico); enquanto que a má segregação de

cromossomos inteiros na anáfase (efeito numérico - aneugênico) seria causada: (i) pela hipometilação das sequências repetidas de ácido desoxirribonucleico nas regiões centromérica e pericentromérica, (ii) defeito nas proteínas do quinetocoro, (iii) disfunção do eixo mitótico, e (iv) genes de ponto de checagem da anáfase defeituosos; já as **pontes nucleoplasmáticas** se originariam de cromossomos dicêntricos, causados por erro de reparo de quebras do ácido desoxirribonucleico, fusão da ponta dos telômeros, e defeito na separação de cromátides na anáfase; enquanto que o **broto nuclear** representaria a eliminação do ácido desoxirribonucleico amplificado, complexos de reparo e cromossomos em excesso de células aneuploides (**Figura 16**).



**Figura 15.** Critérios de identificação e contagem de micronúcleos pelo método de bloqueio da citocinese. **(I)** Células binucleadas em conformidade com os critérios de contagem, pois as respectivas bordas nucleares são distinguíveis: (A) Célula com núcleos distantes; (B) Células com núcleos justapostos. (C-D) Célula com ponte nucleoplasmática. **(II)** Células binucleadas em conformidade com os critérios de contagem, pois cada micronúcleo tem o diâmetro de (1/16 a 1/3) do diâmetro médio dos binúcleos: (A) Micronúcleos distantes dos núcleos; (B) Micronúcleos em contato com núcleos, mas não os sobrepondo; (C) Micronúcleos distantes dos núcleos, que estão ligados por ponte nucleoplasmática; (D) Micronúcleos de vários tamanhos. **(III)** Células binucleadas em não conformidade com os critérios de contagem: (A) Célula trinucleada – o menor dos núcleos tem o diâmetro superior a 1/3 do diâmetro médio dos binúcleos; (B) Presença de pontilhamento no citoplasma; (C) Broto nuclear ligado ao núcleo por ponte nucleoplasmática. (D) Brotos não extruídos dos núcleos. **Fonte:** [FENECH et al \(2003\)](#), com modificações.

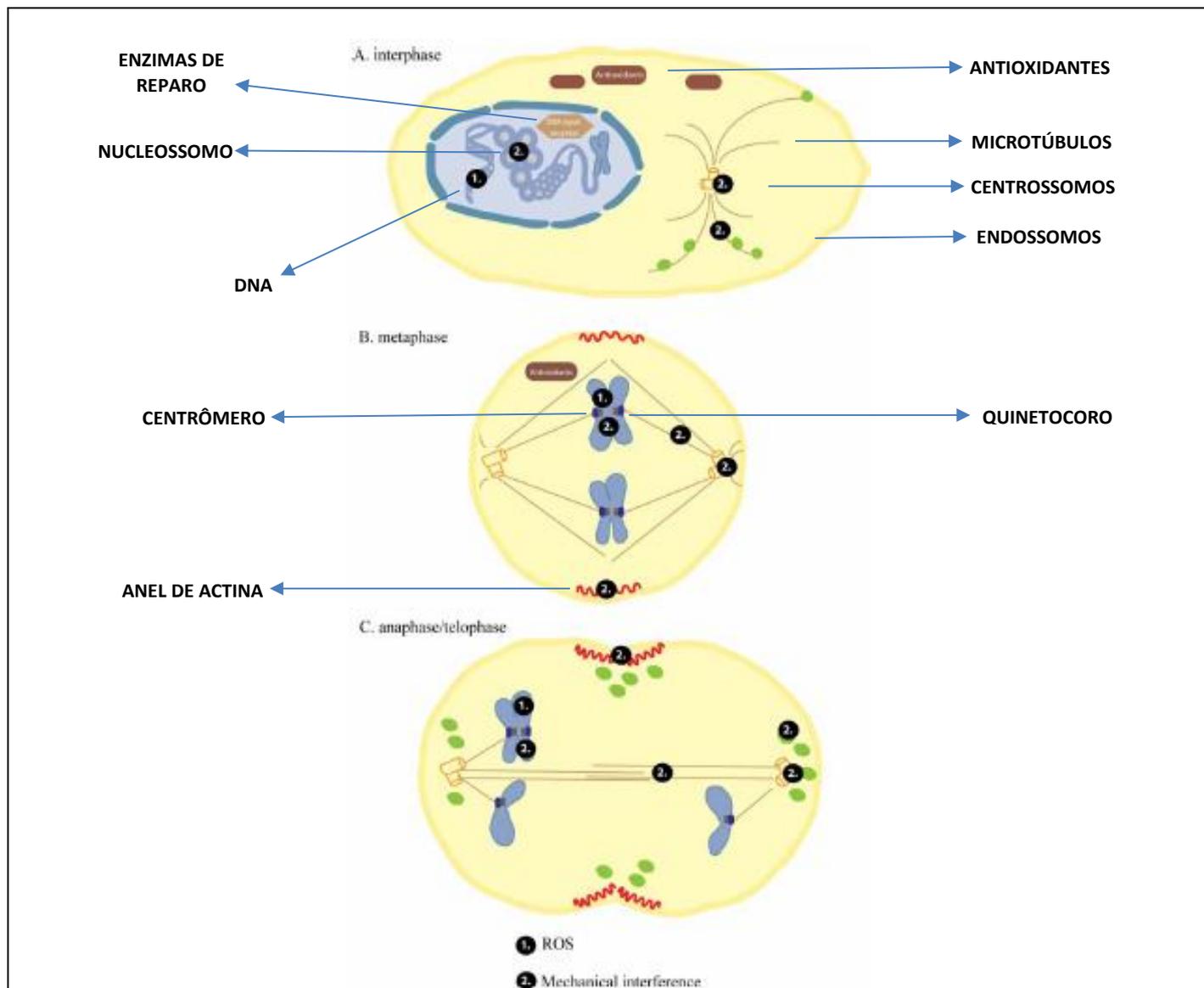


**Figura 16.** Fluxo de eventos possíveis em células expostas a agente (cito)genotóxico durante o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. O dano severo incompatível com a viabilidade celular induz apoptose ou necrose. Os micronúcleos podem se originar da perda de cromossomos inteiros (aneuploidia) ou de seus fragmentos (clastogenia). As pontes nucleoplasmáticas podem se originar de cromossomos dicêntricos. Os brotos nucleares se originam da amplificação genética. Os efeitos citostáticos são medidos pelo índice de proliferação celular (média ponderada de 100 células mononucleadas, binucleadas ou multinucleadas). **Fonte:** [FENECH et al \(2003\)](#), com modificações.

Vários autores – [STONE et al \(2009\)](#), [SINGH et al \(2009\)](#), [GONZALEZ et al \(2011\)](#), [DOAK et al \(2012\)](#), [MAGDOLENOVA et al \(2012\)](#), [PFUHLER et al \(2013\)](#), [NANOGENOTOX \(2013\)](#), [DUSINSKA et al \(2015\)](#) e [DOAK et al \(2017\)](#) – revisaram a literatura ou indicaram a **aplicabilidade** do teste para a avaliação genotóxica de nanomateriais: ele é capaz de determinar com rapidez a frequência de danos e aberrações cromossômicas e de responder a uma variedade de mecanismos genotóxicos, sendo um dos ensaios exigíveis na bateria de avaliação; o método já é amplamente reconhecido para fins regulatórios ([LOUREIRO et al, 2015](#)) e é objeto de harmonização internacional ([OECD, 2010; TG-487](#)). Além das inúmeras recomendações feitas para o ensaio do cometa (no que couber), os autores (e outros mais - [LINDBERG et al, 2009](#); [FALCK et al, 2009](#)) registraram as seguintes **recomendações**: a relação concentração-resposta pode não ser monotônica, com aumento da genotoxicidade em concentrações menores; nanomateriais com fraco efeito genotóxico e pouco efeito específico geralmente não apresentam resultados reprodutíveis; deve ser usada linhagem celular capaz de internalizar o nanomaterial, que tenha estabilidade cariotípica e frequência basal de micronucleação que permita a detecção de efeitos genotóxicos leves, e que tenha sua proficiência de reparo certificada (p53 tipos selvagem ou mutado); o regime de cotratamento deve ser suficientemente prolongado antes da adição da citocalasina (para

garantir a internalização) e o tratamento deve ser continuado pelo período adicional de 1 – 1,5 ciclos celulares (para garantir contato do nanomaterial com o material genético durante a mitose, quando a membrana nuclear é desfeita e depois refeita); a alta dosimetria e a extensa aglomeração poderão dificultar a visualização e a análise (sobreposição, ocultamento e confundimento).

Alguns eventos e **mecanismos** citados sobre nanogenotoxicologia se aplicam ao processo de micronucleação e estão representados na **Figura 17**.



**Figura 17.** Mecanismos possíveis de micronucleação nanogenotóxica. **(1)**: Componentes celulares alvos em mecanismo primário indireto (agentes químicos, como espécies reativas de oxigênio – ROS ou ERO), que agem em qualquer fase do ciclo celular; **(2)**: Componentes celulares alvos em mecanismo primário direto (mecânico); na intérfase, a interação com os microtúbulos retarda o tráfego de endossomos, enquanto que, com os centrossomos, causa aberrações cromossômicas, e com os nucleossomos, altera a expressão gênica ou dificulta a condensação da cromatina e causa aberrações cromossômicas; na mitose, impedem a ligação do microtúbulo ao quinetocoro, causando aneuploidia ou poliploidia; na anáfase e telófase, causa disfunção do anel de actina e então poliploidia.

**Fonte:** [GONZALEZ et al \(2011\)](#), com modificações.

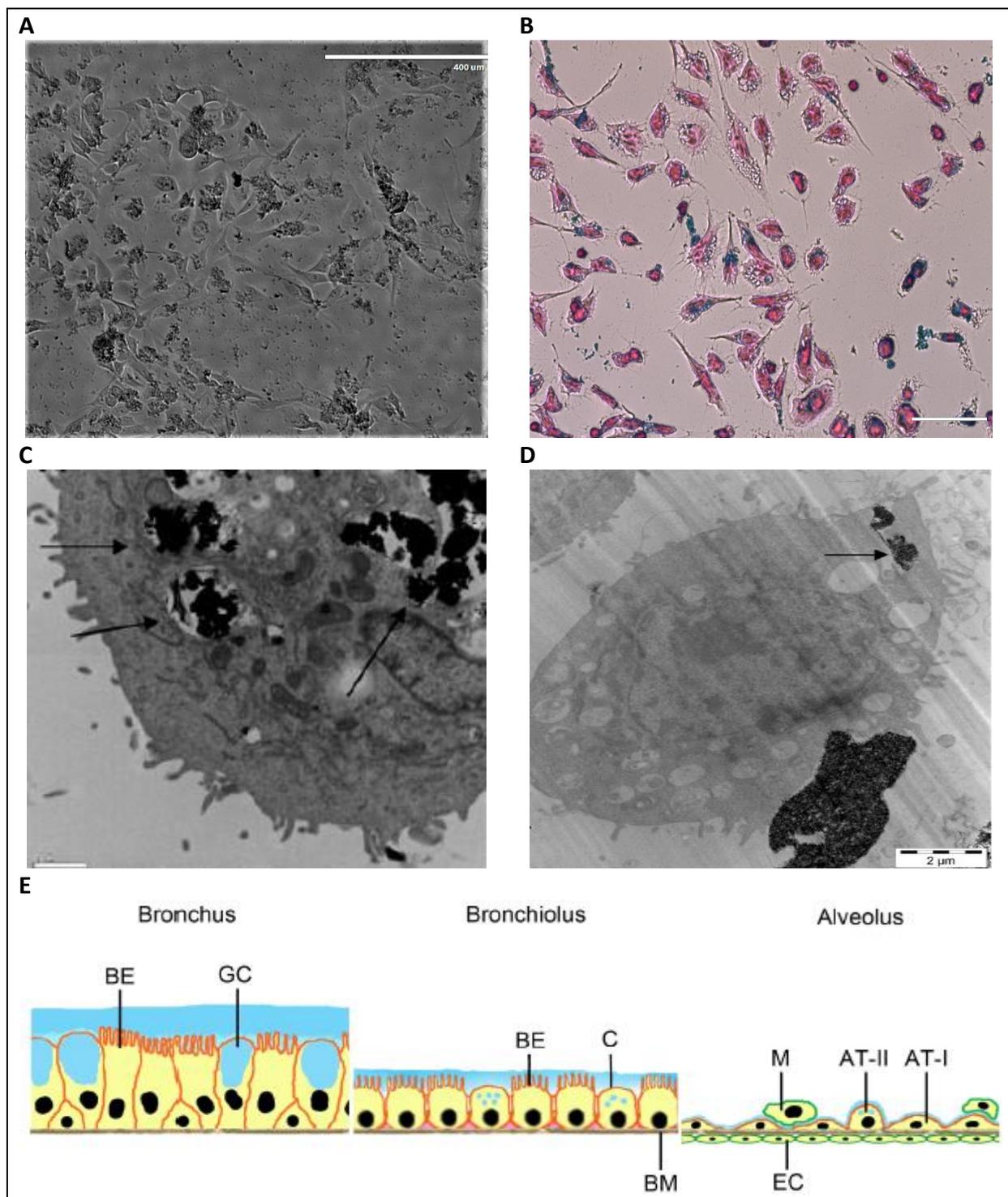
### 1.3. Modelo Biológico

Qualquer modelo celular eucarioto, de forma geral, pode ser usado nos ensaios de genotoxicidade *in vitro* de nanomateriais; para simular uma especificidade orgânica relacionada a certa via de exposição, a linhagem representativa de um **órgão-alvo** pode ser empregada; na sua indisponibilidade, pode-se avaliar a aplicabilidade de cultivo primário de mononucleares periféricos humanos ou de linhagem linfoblastoide como substitutivo; mas é relatado que a variação da sensibilidade na identificação da relação concentração-resposta pode ocorrer ([COWIE et al, 2015](#)).

Independentemente da origem, o **critério** de escolha da linhagem deve considerar a comprovação de sua proficiência na internalização do nanomaterial (quando o delineamento experimental optar pelo monocultivo), consoante anteriormente comentado; a escolha da linhagem celular deve ser justificada nesse sentido ([OECD, 2014](#)).

Um modelo experimental amplamente utilizado para representar o trato respiratório como porta de entrada ou via de administração de matéria (nano)particulada em estudos de carcinogênese inalatória é o cultivo de **linhagem celular do epitélio bronquial humano na ausência de soro** (BEAS-2B; **Figura 18**); tanto que foi amplamente utilizado pelas entidades de higiene industrial que participaram do [NANOGENOTOX \(2013\)](#) ou que revisaram a literatura de genotoxicidade *in vitro* ([GONZALEZ et al, 2008](#); [SINGH et al, 2009](#); [NANOGENOTOX, 2013](#); [MAGDOLENOVA et al, 2014](#)). Como já haviam relatado [LECHNER & LaVECK \(1985\)](#), a maioria dos cânceres pulmonares se originariam do epitélio bronquial e estudos epidemiológicos indicaram que a exposição ambiental a agentes químicos carcinogênicos seria fator de risco para essa patologia. E o modelo é adequado para ensaios de genotoxicidade em monocultivo condicionado, uma vez que também atende ao requisito biológico de aptidão para internalização (endocitose; **Figura 18**).

O processo de **estabelecimento da linhagem** começou com as pesquisas de [LECHNER et al \(1982\)](#) para a parametrização de condições de cultivo necessárias ao crescimento clonal de células normais de epitélio bronquial humano (NHBE) obtidas de explantes traqueobronquiais; a finalidade era estudar a carcinogênese na ausência de soro e outros fatores e indutores da transformação escamosa, e de modo a se controlar o crescimento celular, a diferenciação escamosa, a ativação de intermediários e de metabólitos, a evolução do processo carcinogênico e os mecanismos de reparo genético; eles chegaram à composição do meio de cultivo definido LHC1. Depois, os pesquisadores verificaram que a



**Figura 18.** Cultivos celulares e micrografias de linhagem de epitélio bronquial humano exposta a nanomateriais e tipos celulares do trato respiratório. **(A-B)** Cultivo tratado com  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  por 6 horas e  $51,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; **(A)** Não corados (microscopia de contraste de fase; barra  $400 \mu\text{m}$ ); **(B)** Corados com azul da Prússia e vermelho nuclear rápido (microscopia ótica; barra  $50 \mu\text{m}$ ). **(C)** Cultivo tratado com  $\text{TiO}_2$  por 48 horas (microscopia eletrônica de transmissão; barra  $2 \mu\text{m}$ ). **(D)** Cultivo tratado com nanotubos de carbono de parede simples por 48 horas (microscopia eletrônica de transmissão; barra  $2 \mu\text{m}$ ). **(E)** Tipos celulares do trato respiratório: **BE** – célula epitelial bronquial ciliada; **GC**: célula caliciforme; **C**: célula de Clara; **M**: macrófago celular (diapedese); **AT-I**: célula epitelial alveolar do tipo-I; **AT-II**: célula alveolar do tipo-II; **BM**: célula da membrana basal; **EC**: célula endotelial. **Fontes:** [LINDBERG et al \(2013\)](#), [VALES et al \(2014\)](#) e [FRÖHLICH & SALAR-BEHZADI \(2014\)](#). A e B (do autor).

redução no crescimento clonal observada com a adição de soro era causada pela indução de diferenciação escamosa terminal e era potencializada pela alta concentração de cálcio no meio; também destacaram que essa linhagem manteria o potencial para se diferenciar em epitélio ciliar, mas que a manifestação do fenótipo escamoso era esperada, por ser a típica resposta metaplásica a estresse químico e mecânico, via essa estimulada na presença de soro ([LECHNER \*et al\*, 1984](#)). A composição do meio de cultivo definido **LHC9** foi alcançada por [LECHNER & LaVECK \(1985\)](#) através da adaptação do meio LHC1, permitindo assim o controle da proliferação e da diferenciação da linhagem. [KE \*et al\* \(1988\)](#) e [REDDEL \*et al\* \(1988\)](#) estabeleceram a linhagem BEAS-2B a partir da seleção de subcultivos clonais de linhagem NHBE transformados e imortalizados por infecção com vírus hibridizado Ad12-Sv40 (adenovírus - vírus sincicial símio; daí a nomenclatura **BEAS-2B - epitélio bronquial transformado por vírus hibridizado Ad-Sv, obtido no 2º experimento e isolado da colônia B de subclones**); o objetivo era contornar a rápida senescência da linhagem NHBE, indesejada nos ensaios de carcinogenicidade em múltiplos estágios; o resultado foi a obtenção de uma linhagem com vida de prateleira de até 100 duplicações da população, em até 34 semanas ininterruptas, e com uma alta estabilidade (81% das células eram diploides), e que mantinha a capacidade de transformação, de formação de epitélio traqueal em camundongos atímicos, de produção de mucina quando cultivada em matriz de colágeno e não estabelecimento tumoral em modelo animal após injeção subcutânea. Nesse meio tempo, [REDDEL \*et al\* \(1987\)](#) depositaram a patente da linhagem BEAS-2B e do meio LHC9. Uma das vantagens sobre as células de linhagens cancerígenas é a estabilidade cariotípica daquelas não transformadas ([DOAK \*et al\*, 2012](#)).

A **utilidade e aptidão** dessa linhagem foram confirmadas em várias ocasiões como modelo do trato respiratório e patologias associadas. [NOAH \*et al\* \(1991\)](#) demonstraram a integridade de receptores de histamina e de indução de secretoma pro-inflamatório após o desafio, de forma análoga a cultivo primário, fato útil para o estudo das hipóteses de reparo tecidual e de modulação da inflamação por células epiteliais (propriedade relevante para o cocultivo com células imunes). [KINNULA \*et al\* \(1994\)](#) comprovaram sua capacidade antioxidativa, o que seria essencial para manutenção de sua integridade genética e também útil em estudos de cinética da resposta a estresse oxidativo e da reparação do material genético; claro, isso em delineamentos mais complexos.

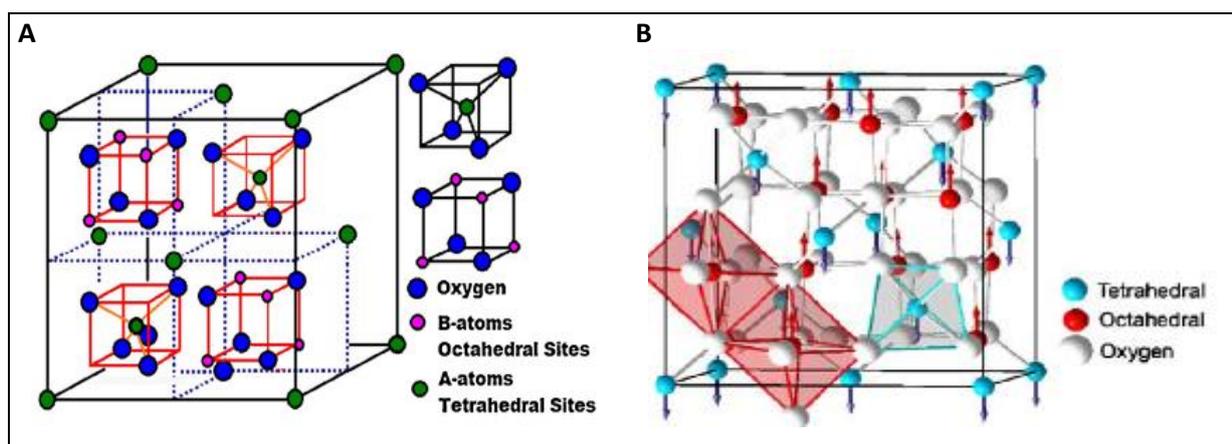
Igualmente, [PASCAL & TESSIER \(2004\)](#) relataram que o modelo é sensível a efeitos citotóxicos de  $Mn^{2+}$ , associados ao aumento da fosfoproteína intracelular e da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) no tratamento com concentrações não citotóxicas; assim, o elemento estaria envolvido no recrutamento celular e na resposta inflamatória e poderia ser causa de mecanismos secundários de genotoxicidade. [TESSIER & PASCAL \(2006\)](#) novamente aferiram a proficiência do modelo para o estudo de dano genético causado pela liberação de  $Mn^{2+}$ , pois a exposição aumentaria a fosfoproteína intracelular (marcadora de ativação da via de resposta a estresse) e a fosforilação das quinases ativadas por mitógeno (ERK1/2 e SAPK/JNK; aumento de 4 vezes), 1 hora após o início da exposição; e isso demonstraria a interrelação entre as vias de sinalização estresse-resposta (SAPK/JNK) e de sinalização anti-apoptótica (ERK1/2). [HONDA et al \(2015\)](#) também desafiaram o modelo com diversos íons metálicos ( $Mn^{2+}$ ,  $V^{4+}$ ,  $V^{5+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ ) e observaram uma relação concentração-resposta linear na redução da viabilidade celular e a secreção pro-inflamatória (IL-6 e IL-8) após 24 horas de tratamento com  $Mn^{2+}$ . E [SUN et al \(2011\)](#) demonstraram que células BEAS-2B extraídas de cultivo transformado após exposição crônica a  $Cr^{6+}$  e injetadas subcutaneamente em camundongos foram capazes de estabelecer a neoplasia.

Ainda, [PARK et al \(2015\)](#) estabeleceram a proficiência celular quanto ao reparo do ácido desoxirribonucleico, uma vez que, apesar do fato da linhagem poder apresentar mutações no códon 47 e polimorfismo do códon 72 do gene *p53*, o modelo ativou a *p53* e a *p21* no desafio com  $As^{3+}$  e  $Cr^{6+}$  e apresentou transformação maligna coerente a esses agentes carcinogênicos. Mas [ZHAO & KLIMECKI \(2015\)](#) alertaram que a adição de soro no meio de cultivo causou o aumento do metabolismo energético celular e as alterações fenotípicas tornaram o modelo mais sensível à citotoxicidade por  $As^{3+}$  (aumento de 5 vezes).

Ademais, em estudo comparativo, o modelo de epitélio bronquial (BEAS-2B) apontou reparo predominante por excisão de nucleotídeos por dano oxidativo do ácido desoxirribonucleico causado pela anatase ( $TiO_2$ ) 4 horas após o início da exposição, sem prejuízo do reparo pela via de excisão de bases, enquanto que o modelo celular de adenocarcinoma epitelial pulmonar (A549) apenas os demonstrou tardiamente, após 48 horas ([BIOLA-CLIER et al, 2016](#)), o que reforçaria a aptidão dessa linhagem para experimentos com nanomateriais em ambos os regimes de tratamento (agudos, subcrônicos e crônicos).

#### 1.4. Modelo Nanotecnológico

As **nanoferritas** são materiais de grande interesse por causa de suas propriedades elétricas e magnéticas singulares, que lhes habilitam a aplicações que abarcam múltiplos aspectos da vida cotidiana. Naquelas com fórmula empírica  $MFe_2O_4$  ( $M$  = cátion divalente de metal de transição  $3d$  =  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ), uma célula unitária de um espinélio contém 8 unidades de fórmula ( $8 \times MFe_2O_4 = 8$  cátions divalentes [ $M^{2+}$ ] + 16 cátions férricos [ $Fe^{3+}$ ] + 32 ânions de oxigênio  $O^{2-}$ ); os ânions se aloca espacialmente num arranjo cúbico de faces centradas (FCC); existem dois tipos de sítios intersticiais nas redes da estrutura do espinélio  $[A]\{B\}_2O_4 \rightarrow$  ( $[A]$  = tetraédrico ou 4 ânions como vértices ou cátion tem 4 coordenações com oxigênios “E”  $\{B\}$  = octaédrico ou 6 ânions como vértices ou cátion tem 6 coordenações com oxigênios)  $\rightarrow$  (Total de sítios em cada célula =  $[A*64] + \{B*32\} = 96$ )  $\rightarrow$  (Distribuição dos cátions divalentes em cada célula  $\rightarrow M^{2+} = 8/64[A] + 16/32\{B\}$ ) (KUMAR *et al*, 2015; SHAHID *et al*, 2017; ANSARI & KHAN, 2017; SI *et al*, 2017). A estruturação em uma célula está representada na **Figura 19**.



**Figura 19.** Representação de uma célula unitária de um espinélio  $MFe_2O_4$  ( $M = Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ). (A) Distribuição iônica pelos sítios. (B) Alinhamento dos *spins* dos cátions ocupando os sítios tetra e octaédricos. **Fontes:** HARRIS (2009) e KUMAR *et al* (2015).

Os **espinélios de manganês** possuem estrutura mista ou parcialmente invertida, com distribuição catiônica parcialmente inversa; isto é, há cátions de ambas as valências ocupando ambos os sítios A e B, mas em proporções desbalanceadas; a distribuição dos cátions é determinada por propriedades como raio iônico, energia eletrostática e configuração eletrônica; como os íons de manganês possuem propriedades comparáveis aos de ferro, na substituição a inversão é parcial (isto é, o grau de inversão “ $\delta$ ”, que representa a fração de átomos  $Mn^{2+}$  nos sítios tetraédricos, é “ $\delta < 1$ ”)  $\rightarrow$  ( $[Mn^{2+}_{1-\delta}Fe^{3+}_{\delta}]_A[Mn^{2+}_{\delta}Fe^{3+}_{2-\delta}]_B O_4$ ); se ( $\delta = 0,2$ )  $\rightarrow$  ( $[Mn^{2+}_{0,2}Fe^{3+}_{0,8}]_A[Mn^{2+}_{0,2}Fe^{3+}_{1,8}]_B O_4$ ); por

causa dessa baixa inversão e da baixa anisotropia cristalina, as ferrita de manganês é uma isoestrutura denominada “ferrita mole” ou “material de fase magnética leve” ([HARRIS, 2012](#); [DEVI & SOIBAM, 2017](#); [ANGOTZI et al, 2017](#)).

Nessas estruturas, o magnetismo surge do **mecanismo de supertroca** entre os sublátices; como o *spin* nos sítios A e B, que, por serem antiparalelos, denotam um nível basal negativo da supertroca, a magnetização é reduzida. Assim, a principal estratégia para se aumentar a magnetização é causar um desequilíbrio positivo entre a magnetização dos subredes (alterar a interação AB); e isso é conseguido pela substituição de cátions não magnéticos por outros magnéticos ([HARRIS et al, 2009](#); [HARRIS, 2012](#)). Dentre os metais de transição (bloco-d), o manganês é um dos preferidos, e a sua ferrita se destaca há muito tempo no campo das ciências dos materiais, por causa da sua resistência a oxidação, seu magnetismo e sua afinidade por biomoléculas; a substituição com  $Mn^{2+}$  lhes confere alta magnetização de saturação e baixa constante de anisotropia, fatores distintivos sem comparação com outras estruturas magnéticas; ainda, são quimicamente mais estáveis, e a ausência da liberação de íons e da ocorrência de reações de Fenton previnem efeitos citotóxicos indesejados ([TOURINHO et al, 1989](#); [SOUSA et al, 2001](#); [FROLOVA & DERHACHOV, 2017](#); [LONG et al, 2017](#); [KULKARNI et al, 2017](#); [PAZIK et al, 2017](#))

O problema é que, além da composição, vários outros **fatores** são essenciais e codependentes na determinação das propriedades das nanoferritas. Via de regra, a aplicação desejada implicará no delineamento de uma estratégia de síntese para atingi-la ([CRUZ et al, 2017](#)). De modo simplificado, constituem fatores críticos na customização para aplicação: (I) na magnetohipertermia – a perda específica de energia, que depende do relaxamento magnético (derivado do mecanismo de Néel, por reorientação do *spin* quando o campo magnético é removido, e de Brown, por fricção das nanopartículas com o líquido), e o qual é positivamente dependente da magnetização de saturação e da constante de anisotropia, e é negativamente dependente do tamanho; e (II) na contrastação por ressonância magnética – a magnetização de saturação, que depende da composição e do tamanho ([JANG et al, 2009](#)).

Assim, apesar do manganês ( $Mn^{2+}$ ) atender aos requisitos acima citados, esses também devem ser considerados em função da origem radicante do nanomaterial, isto é, da **síntese** e seus fatores que condicionam a redistribuição e o grau de inversão dos cátions metálicos, o comprimento das ligações entre eles e o ângulo entre os sítios tetra e

octaédricos, quais sejam: (i) composição – tipos de cátions e suas propriedades atômicas e iônicas, sua pureza, a razão molar das fontes de  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ ; (ii) forma – presença de bandas quebradas e orientação anisotrópica; (iii) tamanho – correspondente a uma única célula unitária ou configuração monodomínio (< 15nm), o que também garante o fenômeno do superparamagnetismo (todos os *spins* se orientam paralelamente e em função do campo magnético, evitando interações de atração entre nanopartículas); (iv) demais fatores que influenciam a estrutura, sua morfologia e o tamanho ([TOURINHO et al, 1989](#); [RALAND et al., 2017](#); [DEVI & SOIBAM, 2017](#); [SI et al, 2017](#); [VELINOV et al, 2017](#); [RASHMI et al, 2017](#); [KOMBAIAH et al, 2017](#); [IRANMANESH et al, 2017](#); [GOLSEFIDI et al, 2017](#); [WADEHRA et al, 2017](#); [ASIRI et al, 2018](#)).

#### 1.4.1. Aplicações

A conjugação das propriedades **elétricas e magnéticas** dos óxidos de ferro nanoestruturados, associada a sua apresentação na forma fluida coloidal e estável (nanofluido), conduz a uma multitude de aplicabilidades tecnológicas ([TOURINHO et al, 1989](#)). As aplicações biomédicas de nanotecnologias, incluindo óxidos de ferro superparamagnéticos, foram recentemente revisadas e sumarizadas por [SU et al \(2018\)](#); entre essas aplicações destacam-se o diagnóstico por imagem (ressonância magnética) ou laboratorial (detecção e separação magnética de anticorpos e ligantes), a terapia (carreamento de ativos) e a instrumentação (sondas de captura por interação magnética e aparelho portátil de espectroscopia molecular por ressonância magnética). Ao contrário das centenas de artigos publicados sobre a nanopartícula mais popular ( $Fe_3O_4$ ), os estudos com  $MnFe_2O_4$  estão cada vez mais presentes na literatura ([PAZIK et al, 2017](#)). Tanto é que, em pesquisa por recorte temporal (2017) no portal *Web of Science* para o termo “ $MnFe_2O_4$ ”, verificou-se que esse nanomaterial está sendo sintetizado por várias vias, usando-se múltiplas técnicas, diversas funcionalidades e inúmeras formas de apresentação (nanomaterial singular, hibridizado, composto, conjugado ou depositado, ou, em pó ou dispersão); e está sendo estudado quanto à aplicação de suas propriedades elétricas e magnéticas para inúmeras finalidades (**Quadro 2**).

Repisando o que foi anteriormente grafado, todas essas aplicações implicam a síntese industrial, a manipulação intermediária ou final e a aplicação das nanopartículas de ferrita de manganês; e isso, por si só, gera um cenário potencial de ocorrência de exposição

em distintos estágios do **ciclo de vida** que esses nanomateriais venham a ter (ocupacional, por consumo, ambiental), e cujo risco deve ser quantificado e avaliado. E as informações de caráter toxicológico geradas poderão direcionar a segurança baseada em prevenção, mitigação ou delineamento e modelagem do material (isto é, a biossegurança é atingida por meio da biocompatibilidade).

#### 1.4.2. Funcionalizações

Entretanto, enquanto a manipulação do tamanho, da forma e da composição parametriza as propriedades do nanomaterial, a modificação ou funcionalização da sua superfície é um fator essencial na **translação** dessas propriedades elétricas e magnéticas customizadas para as aplicações pretendidas ([MONTFERRAND \*et al\*, 2012](#); [SINGH \*et al\*, 2014](#)); isto é, requer a estabilidade do coloide em vários meios dispersantes e no meio biológico, inclusive na presença de campo magnético ([BACRI \*et al\*, 1990](#)).

A utilização de [ácido meso-2,3-dimercaptossuccínio \(Dmsa\)](#) como cobertura de ferrita foi amplamente revisada por [ZHANG \*et al\* \(2016\)](#); eles registraram que: a molécula é um ditiol [ $2x(-SH)$ ]; sua oxidação ao redor da superfície das nanopartículas forma uma rede de moléculas interligadas por ligações cruzadas entre os grupos tiol (pontes dissulfeto); o excesso de grupos carboxilato livres confere potencial zeta negativo às nanopartículas; esses grupos também podem ser usados para ligação com outras moléculas, permitindo a formação de nanoestruturas multifuncionais; não é tóxico para humanos e nem em modelos animais; quelar íons de metais pesados, formando ligações metal-enxofre estáveis; é biocompatível. Desta feita, sua utilização se justifica na estabilização eletrostática de um coloide.

Quanto ao [citrato](#), é uma molécula orgânica presente nos compartimentos orgânicos e citoplasma, bastando dizer que ele faz parte da respiração celular, pois é um substrato essencial do ciclo de Krebs (ou Ciclo do Ácido Cítrico) e participa de várias vias metabólicas celulares, tanto na homeostasia, quanto na ocorrência de patologias diversas ([IACOBACCI & INFANTINO, 2014](#)). Ainda, em situações de sobrecarga sistêmica de ferro acima da capacidade de ligação da transferrina, funciona como quelante oligomérico de íon férrico ( $Fe_3Cit_3$ ), que pode ser internalizado por hepatócitos e linfócitos T ([AREZES \*et al\*, 2013](#)). Portanto, é biocompatível e adequado para a estabilização eletrostática de nanopartículas.

**Quadro 2.** Exploração das propriedades magnéticas e elétricas de nanomateriais contendo nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) para aplicações nanotecnológicas potenciais em diversas atividades econômicas.

Aplicação	Autor(es)			
Catalisador	<a href="#">KHILARI &amp; PRADHAN (2017)</a> <a href="#">WANG et al (2017<sup>1</sup>)</a> <a href="#">MARTINS et al (2017)</a> <a href="#">ABROSHAN et al (2018)</a> <a href="#">GOLSEFIDI et al (2017)</a>	<a href="#">JACINTHA et al (2017)</a> <a href="#">HE et al (2017)</a> <a href="#">ZHAO et al (2017)</a> <a href="#">ZHOU et al (2018)</a> <a href="#">HUANG et al (2017)</a>	<a href="#">KIM et al (2017)</a> <a href="#">CHIANG et al (2017)</a> <a href="#">TAN et al (2017)</a> <a href="#">BHUYAN et al (2018)</a>	<a href="#">RASHMI et al (2017)</a> <a href="#">LI et al (2017<sup>1</sup>)</a> <a href="#">MUMTAZ et al (2017)</a> <a href="#">BABAEI et al (2018)</a>
Sensor químico	<a href="#">MADHURA et al (2017)</a> <a href="#">MATATAGUI et al (2017)</a>	<a href="#">KOOTI et al (2018)</a>	<a href="#">ZHOU et al (2017)</a>	<a href="#">ZHANG et al (2018)</a>
Condutor, capacitor e dispositivos de armazenamento de energia	<a href="#">XIAO et al (2017)</a> <a href="#">NAVEED et al (2017)</a> <a href="#">GUO et al (2017)</a>	<a href="#">LIU et al (2017)</a> <a href="#">YAN et al (2017)</a> <a href="#">KULKARNI et al (2017)</a>	<a href="#">WEI et al (2017)</a> <a href="#">KWON et al (2017)</a> <a href="#">ARSALANI et al (2018)</a>	<a href="#">YANG et al (2017)</a> <a href="#">SI et al (2017)</a>
Remediação ambiental - Co(II), Cr(VI), Au(III), Pd(III), Ag(III), As(III), Pt(IV), Pb(II), tinturas, cinzas de queimada, bezafibrato, poliaromáticos cíclicos (PAHs)	<a href="#">GHANBARIAN et al (2017)</a> <a href="#">KAFSHGARI et al (2017<sup>1</sup>)</a> <a href="#">KAFSHGARI et al (2017<sup>2</sup>)</a> <a href="#">MARTINEZ-VARGAS et al (2017)</a> <a href="#">YOUNIS &amp; MOUSTAFA (2017)</a> <a href="#">HESAMPOUR et al (2017)</a>	<a href="#">LI et al (2017<sup>2</sup>)</a> <a href="#">CHEN et al (2017)</a> <a href="#">YANG et al (2017)</a> <a href="#">BACH et al (2018)</a> <a href="#">REDDY et al (2017)</a>	<a href="#">RAHMANIA et al (2017)</a> <a href="#">HU et al (2017)</a> <a href="#">WU et al (2017)</a> <a href="#">MEENA et al (2017)</a> <a href="#">BHOWMIK et al (2017)</a>	<a href="#">SUN et al (2017)</a> <a href="#">NEYESTANI et al (2017)</a> <a href="#">STOIA et al (2017)</a> <a href="#">MA et al (2018)</a>
Isolante e antichamas	<a href="#">WANG et al (2017)</a>			
Detecção Raman	<a href="#">VAN SON et al (2017)</a>			
Absorção de microondas	<a href="#">MASHADI &amp; MULYAWAN (2018)</a>			
Acoplamento eletromecânico	<a href="#">BEHERA &amp; CHOUDHARY (2017)</a>			
Sistemas de comunicação	<a href="#">LAI et al (2017)</a>			
Refrigeração	<a href="#">DADARLAT et al (2017)</a>			
Dessanilização	<a href="#">CHEN et al (2017)</a>			
Magnetohipertermia	<a href="#">HEIKHAM &amp; THIYAM (2017)</a> <a href="#">HAMMAD et al (2017)</a>	<a href="#">ZAIDAN et al (2017)</a> <a href="#">ANAND et al (2017)</a>	<a href="#">RALAND et al (2017)</a> <a href="#">MDLALOSE et al (2018)</a>	<a href="#">DAFFÉ et al (2017)</a>
Ressonância	<a href="#">CHAKRABORTY et al (2017)</a>	<a href="#">ZHANG et al (2017)</a>	<a href="#">BANERJEE et al (2017)</a>	
Biosusceptometria	<a href="#">LADINO et al (2017)</a>			
Entrega direcionada de ativo	<a href="#">AMOLI-DIVA et al (2017)</a>	<a href="#">CHO et al (2017)</a>		
Antimicrobriano	<a href="#">KURTAN et al (2017)</a>	<a href="#">ASHWINI et al (2017)</a>		
Biosensor e bioconcentrador	<a href="#">RASHID et al (2017)</a>	<a href="#">LONG et al (2017)</a>		
Terapias (foto)térmica/dinâmica	<a href="#">WU et al (2017)</a>	<a href="#">KIM et al (2017)</a>	<a href="#">CHEN et al (2017)</a>	

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se as promissoras aplicações das nanopartículas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , concorrentemente com a **exiguidade de dados** publicados a respeito de sua citotoxicidade e a inexistência de informação científica disponível a respeito de seu potencial genotóxico comparativo *in vitro*, justificou-se a consecução da presente pesquisa.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a **toxicidade** de nanopartículas de ferrita de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) sintetizadas por meio das vias de coprecipitação (Cp) e decomposição térmica (Td), recobertas ou não com citrato (Cit) ou ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa), em modelo biológico representativo da rota inalatória de exposição ocupacional (células imortalizadas de epitélio bronquial humano – BEAS 2B).

### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os parâmetros físico-químicos das nanopartículas e seu comportamento no meio de cultivo celular;
- Verificar sua internalização celular;
- Avaliar sua citotoxicidade;
- Analisar seu potencial genotóxico; e
- Correlacionar diferenças dos efeitos citotóxicos e genotóxicos com os fatores concentração de exposição, tempo de exposição, via de síntese e a cobertura das nanopartículas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Síntese dos nanomateriais

As nanopartículas de **ferrita de manganês ( $MnFe_2O_4$ )** foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa, da Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília (UnB), por meio das vias de coprecipitação (Cp), consoante descrito por [NUNES \*et al\* \(2014\)](#), e decomposição térmica (Td), definida por [SUN \*et al\* \(2004\)](#), e então foram recobertas, ou não, com citrato (Cit) ou ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa); as funcionalizações com Dmsa seguiram [FAUCONNIER \*et al\* \(1997\)](#). Os nanomateriais obtidos por coprecipitação foram sintetizados no mesmo lote; os por decomposição térmica em solvente orgânico, em lotes distintos, porque essa última metodologia não permite a obtenção de nanomateriais na forma não dispersa (pó).

Deste modo, foram sintetizados 5 nanomateriais: (1)  **$MnFe_2O_4$ -Cp** – sintetizado por coprecipitação e sem cobertura; (2)  **$MnFe_2O_4$ -CpCit** – sintetizado por coprecipitação e com cobertura de citrato; (3)  **$MnFe_2O_4$ -CpDmsa** – sintetizado por coprecipitação e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico; (4)  **$MnFe_2O_4$ -TdCit** – sintetizado por decomposição térmica e com cobertura de citrato; (5)  **$MnFe_2O_4$ -TdDmsa** – sintetizado por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico.

### 4.2. Caracterização dos nanomateriais

#### 4.2.1. Morfologia e diâmetro primário

A **forma** e o **diâmetro primário** das nanopartículas foram caracterizados em parceria com o grupo coordenado pelo Dr. Sergio Enrique Moya (CIC biomaGUNE, Espanha), conforme o seguinte procedimento: a dispersão estoque de cada nanomaterial (como recebida após a síntese) foi homogeneizada em vórtex; uma alíquota de 1  $\mu$ L dessa dispersão foi redispersa em 1 mL de água ultrapura e ultrasonicada por 15 minutos em banho com gelo (FB 15051, Fisher Scientific); 3  $\mu$ L de cada redispersão foram espalhados sobre grade de cobre e carbono (malha 300), e então secados durante a noite; as micrografias foram capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-2100F); a forma e o tamanho de 500 nanopartículas foram mensurados com o software ZEN 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011); usou-se a distribuição normal para a análise do diâmetro.

#### 4.2.2. Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico

Inicialmente, o **diâmetro hidrodinâmico** das nanopartículas foi analisado no equipamento **Nanosight NS300** (Malvern, UK), composto de microscópio (LM10), laser (LM14) e aplicativo de captura e tratamento de imagens (NTA 3.0 Analytical Software), no laboratório liderado pela Dra. Irina Estrela-Lopis (*Medizinische Fakultät Institut für Medizinische Physik und Biophysik – ULEI - Universität Leipzig, Alemanha*). As amostras foram preparadas da seguinte forma: a dispersão estoque de cada nanomaterial (como recebida após a síntese) foi homogeneizada em vórtex; uma alíquota proporcional dessa dispersão foi diluída em água ultrapura (1:10 v/v) e ultrasonificada em banho com gelo por 10 minutos, com amplitude de 10% e pulso constante (Branson Digital Sonifier, Meinhart); uma alíquota foi rediluída em água ultrapura em proporção volumétrica suficiente para o ajuste da concentração adequada para a leitura ( $10^7$ - $10^9$  partículas/mL); então, 1 mL dessa redispersão foi injetado com seringa plástica na câmara de leitura acoplada ao microscópio.

O **diâmetro hidrodinâmico** e o **potencial zeta** das nanopartículas também foram analisados no *Finnish Institute of Occupational Health (FIOH, Finlândia)*, utilizando o equipamento **Zetasizer Nano-ZS90** (Malvern, UK). As amostras foram preparadas da seguinte forma: a dispersão estoque de cada nanomaterial (como recebida após a síntese) foi homogeneizada em vórtex; uma alíquota proporcional dessa dispersão foi diluída em água molecular (pH = 5,7), em um tubo de ensaio de 15 mL, até a concentração final de  $102,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; foi ultrasonificada em banho com gelo por 15 minutos, na frequência de 37 kHz e potência de 30 W (ElmaSonic S15H, Tovatech LLC South Orange, NJ, USA); então, uma alíquota de 1 mL foi colocada em: (i) cubeta descartável de poliestireno, e o diâmetro hidrodinâmico e sua (poli)dispersão foram mensurados com laser a um ângulo de  $173^\circ$  e a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ ; ou (ii) célula descartável de poliestireno, e o potencial zeta aferido.

Ademais, amostras preparadas analogamente e empregadas nos ensaios biológicos, conforme descrito na seção abaixo, também foram analisadas para ambos os parâmetros no mesmo Zetasizer, para fins de apuração do **comportamento dos nanomateriais** em solução de albumina sérica bovina (BSA), na presença e na ausência de meio de cultivo celular sem soro (LHC9).

### 4.3. Ensaios biológicos

#### 4.3.1. Preparo das dispersões utilizadas nos tratamentos

O preparo das dispersões dos nanomateriais utilizadas nos ensaios biológicos foi realizado conforme proposto no protocolo desenvolvido pelo projeto [NANOGENOTOX \(2013\)](#), com adaptações (sem utilização de etanol e sonicação com ultrassom). Primeiramente, uma solução estéril de **albumina sérica bovina** (BSA, 66 kDa, Sigma Aldrich) foi preparada em água ultrapura (0,05% p/v, após microfiltração); a dispersão estoque de cada nanomaterial (como recebida após a síntese) foi homogeneizada em vórtex; uma alíquota dessa dispersão foi misturada a um volume proporcional da solução de BSA, em tubo de ensaio de 15 mL, até se completar o volume desejado e a concentração de 2,56 mg.mL<sup>-1</sup> de nanomaterial; a mistura foi ultrasonicada em banho com gelo por 15 minutos, na frequência de 37 kHz e na potência de 30 W (ElmaSonic S15H, Tovatech LLC South Orange, NJ, USA); uma alíquota da solução de BSA (para os grupos controle) e várias da mistura do nanomaterial com a solução de BSA (para os grupos tratados) foram diluídas no **meio de cultivo (LHC9)**, em tubo de ensaio de 15 mL exclusivo para cada grupo experimental, até se atingir a respectiva concentração utilizada nesse grupo (concentração, em massa); as novas misturas foram então redispersas novamente por ultrasonicação (15 minutos, 37 kHz e 30 W, em banho com gelo) e o volume requerido foi administrado imediatamente a cada unidade experimental. Aparte o volume utilizado nos ensaios biológicos, uma alíquota das misturas finais em albumina e em meio de cultivo (1 mL) foram avaliadas no equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, UK) quanto ao diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta.

#### 4.3.2 Cultivo celular

A linhagem celular aderente utilizada foi a de **epitélio bronquial humano normal imortalizado** (BEAS-2B, *American Type Culture Collection – ATCC*, CRL-9609, Lote 59227035).

Os cultivos e subcultivos celulares foram estabelecidos conforme metodologia já padronizada pelo *Department of New Technologies and Risks, Work Environment Development (FIOH)*, suprida pelo Dr. Hannu Norppa, e foram mantidos em colaboração com sua equipe.

Todos os procedimentos foram executados em ambiente estéril, usando material previamente esterilizado e com paramentação consoante as regras de biosegurança.

Antes do início dos trabalhos, o **procedimento geral** de preparo da sala de cultivo constituiu-se de inicialização do fluxo laminar (KR-125 Safety, Kojair Tech Oy, FI), sua limpeza e desinfecção com etanol 70% (v/v) e exposição à radiação UV por, no mínimo, 15 minutos sobre a superfície limpa, de modo a reduzir a possibilidade de contaminação cruzada. Ao final de cada procedimento o fluxo foi desinfetado com cloreto de belzalcônio 1% (p/v) e posteriormente com etanol 70%.

Todos os reagentes foram mantidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e então foram descongelados e mantidos refrigerados a  $4^{\circ}\text{C}$ . Antes da utilização, foram mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$  (quando necessário) ou previamente aquecidos a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria (Aqualine AL 12\_AL 5, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co, DE), usando-se solução desinfetante no fluido de aquecimento (Aqua-Stabil, 0,2% v/v, Julabo Labortechnik GmbH, DE).

Cada unidade de cultivo mantida armazenada em crio-estase (CryoTube, Nunc, DK) a  $-150^{\circ}\text{C}$  (Ultra-low temperature freezer, MDF-C2156VAN Vip Plus, Panasonic, JP), e contendo  $2.10^6$  células em 2 mL de meio de cultivo, foi imediatamente descongelada em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , diluída em mais 8 mL de meio de cultivo LHC9 (1x; Gibco, Life Technologies, USA) em um frasco de 15 mL (genérico, VWR International GmbH, DE) e então foi centrifugada a 1.100 rotações por minuto, por 5 minutos e em temperatura ambiente (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, DE). O sobrenadante foi removido com bomba de vácuo (Master Jet, Heto-Holten A/S, DK; ou; BVC Control, Vacuubrand GmbH, DE) e ponteira descartável (Midi Plus, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, FI). O *pellet* foi resuspendido em 1mL de meio de cultivo e semeado em garrafa T75 (Nunc, DK) sem tratamento prévio de superfície, a uma densidade aproximada de  $0,27.10^5$  células. $\text{cm}^{-2}$ . Mais meio de cultivo foi adicionado ao frasco até se completar 15 mL, perfazendo um volume de  $0,2 \text{ mL.cm}^{-2}$ . O cultivo foi então incubado ( $\text{CO}_2$  incubator, MCO-20AIC, Sanyo Electric Company, JP) nas condições ambientais de temperatura ( $37^{\circ}\text{C}$ ), umidade (80%) e saturação (5%  $\text{CO}_2$ ) preconizadas para a linhagem celular; e assim foi mantido até o estabelecimento da fase de crescimento exponencial. Antes de se atingir a confluência, foi realizada a passagem, valendo-se de uma densidade de, no mínimo,  $4.10^3$  células. $\text{cm}^{-2}$  ( $3.10^5$  células por garrafa). Todo cultivo foi submetido a, pelo menos, uma passagem antes de ser coletado para subcultivo em placas ou lâminas para os ensaios biológicos. Toda vez que necessário, antes de realizar nova passagem, o meio de cultivo foi removido, o cultivo foi lavado em 15

mL de DPBS [1x; (-)Mg; (-)Ca; HyClone, GE Healthcare Life Sciences, USA) a 37°C, e meio fresco foi novamente adicionado.

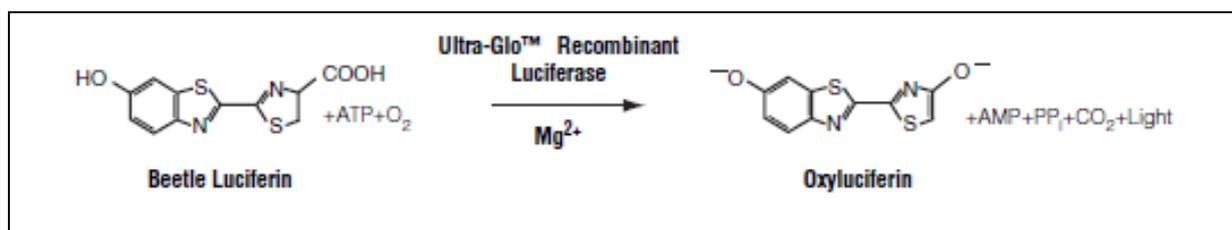
Tanto para a realização das **passagens** quanto para o **subcultivo**, o meio foi removido, o cultivo lavado, o substrato digerido em solução de tripsina a 0,05% (p/v) - ácido etilenodiaminotetracético a 53 mM (1x; Gibco, Life Technologies, USA) na proporção de 0,04 mL.cm<sup>-2</sup> (3 mL para uma garrafa T75) e por até 5 minutos, em incubadora. O desprendimento das células aderidas foi confirmado por microscopia invertida (IMT-2, Olympus Optical Company, JP). A enzima foi então neutralizada pela adição de meio de cultivo RPMI 1640 [1x; (-)Glu; Gibco, Life Technologies, USA) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado por calor (1x; Gibco, Life Technologies, USA) e adicionado de antibióticos [Estreptomicina (10<sup>4</sup> µg.mL<sup>-1</sup>) + Penicilina (10<sup>4</sup> UI.mL<sup>-1</sup>); HyClone, GE Healthcare Life Sciences, USA) e na proporção de 0,08 mL.cm<sup>-2</sup> (6 mL para uma garrafa T75). O conteúdo foi todo transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 1.100 rotações por minuto, por 5 minutos e em temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi retirado, o *pellet* resuspendido em 1.010 µL de meio de cultivo LHC9, uma alíquota de 10 µL foi transferida para um tubo de 1 mL e diluída em 90 µL de mais meio (fator de diluição = 10) para contagem manual em hemocitômetro com profundidade de 0,1 mm (câmara de Bürker, Menzel GmbH, DE) e observado em microscópio invertido de contraste de fase ou em microscópio invertido de fluorescência (EVOS fl, Advanced Microscopy Group, USA). Durante esta operação, as células foram avaliadas quanto a sua qualidade (morfologia, dispersão e presença de contaminação). Após a apuração do quantitativo total de células disponíveis, o volume proporcional contendo a quantidade desejada para o procedimento foi então diluído no volume total exigido de meio LHC9. Tal volume foi então transferido integralmente para nova garrafa (passagem) ou então fracionado e equitativamente plaqueado (subcultivo). Procedeu-se, então, a novo período de incubação, respeitando-se, em todo caso, o limite de confluência para nova passagem, subcultivo ou exposição aos nanomateriais testados (< 80%).

#### 4.3.3. Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina

A viabilidade celular foi avaliada para fins de determinação do regime de tratamento (concentração, µg.mL<sup>-1</sup>; tempo, horas) a ser aplicado nos ensaios de genotoxicidade; para o

respectivo tempo de exposição, a maior concentração foi aquela a causar uma redução máxima de até 55% da viabilidade. Isto porque concentrações maiores poderiam induzir achados estatisticamente significativos de danificação do ácido desoxirribonucleico ou do cromossomo, secundária e exclusivamente causados pela própria citotoxicidade (apoptose e necrose); e com isso, se aumentaria a probabilidade de ocorrência de resultados falso positivos ou de quantitativo de células inferior ao exigido para a realização dos ensaios.

A **metodologia** empregada para a aferição da viabilidade celular foi a quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina (ATP), que tem relação linear com o quantitativo de células metabolicamente viáveis em cada subcultivo analisado. Trata-se do ensaio denominado *CellTiter Glo One Solution* (Promega Biotech AB, USA). O mecanismo bioquímico de geração do sinal luminométrico, que tem meia vida estendida e superior a cinco horas, se dá pela mono-oxigenação enzimática da luciferina pela luciferase recombinante patenteada (*Ultra-Glo*) na presença dos substratos celulares (ATP,  $Mg^{2+}$  e  $O_2$ ) (**Figura 20**).



**Figura 20.** Mecanismo bioquímico de produção de sinal luminescente no ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina. **Fonte:** [Promega Technical Bulletin TB288](#).

O ensaio foi realizado no *Finnish Institute of Occupational Health* (FIOH) como um experimento com replicação biológica (6 replicatas por grupo; **controle negativo e 5 tratados com 25,6 a 256  $\mu g.mL^{-1}$** ), avaliando-se a viabilidade em três **pontos temporais** de exposição: (i) **6 horas**, com o intuito de se verificar a viabilidade em quadro de exposição aguda e com duração homóloga àquela antecedente à administração do bloqueador de citocinese no teste do micronúcleo, e também para garantir a incoerência de viés no primeiro ponto de aferição de dano do ácido desoxirribonucleico (ensaio do cometa), considerando-se que as ferritas de manganês não são solúveis em meio aquoso; (ii) **24 horas**, para apuração de viabilidade no segundo tempo de análise de dano em DNA; e (iii) **48 horas**, conforme a viabilidade esperada à conclusão do teste do micronúcleo. As concentrações regrediram a partir da concentração de 256  $\mu g.mL^{-1}$ , que foi sugerida como limite superior pelo protocolo de dispersão padronizado ([NANOGENOTOX, 2013](#)).

As células foram coletadas das garrafas e os subcultivos introduzidos em microplacas de poliestireno com 96 poços (View-Plate – 96 TC, PerkinElmer Incorporated, USA), de corpo branco opaco e fundo transparente e chato, com área de superfície de  $0,32 \text{ cm}^2$  e volume de trabalho  $200 \mu\text{L}$ , perfazendo uma densidade inicial de  $10^4 \text{ células.cm}^{-2}$ , mantidas em  $200 \mu\text{L}$  de meio LHC9. As placas foram incubadas ( $37^\circ\text{C}$ , 80% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ ) por até 36 horas previamente à exposição. Conferida a taxa de confluência, o meio de cada poço foi removido por aspiração, as dispersões de tratamento em meio LHC9 foram adicionadas ( $100 \mu\text{L}$  por poço) e a exposição acompanhada diariamente até a luminometria.

Completo o tempo de exposição, as placas foram retiradas da incubação, as dispersões de tratamento foram removidas por aspiração, cada poço foi lavado três vezes com DPBS a  $37^\circ\text{C}$ , e meio LHC9 fresco foi adicionado ( $100 \mu\text{L}$  por poço). As placas foram novamente incubadas por 210 minutos, tempo após o qual foram retiradas e então mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para o atingimento de equilíbrio térmico (aclimatação). A solução do substrato reativo foi diluída em tampão (*One Solution*) e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$ ; antes do uso, foi colocada em meio protegido da luz para também atingir o equilíbrio térmico antes da adição nos subcultivos celulares. A solução reagente foi adicionada ao meio de cultivo ( $100 \mu\text{L}$  por poço) e então inserida no luminômetro-fluorímetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific Oy, FI) equipado com *software* de nomenclatura homóloga (versão 2.6). As placas foram agitadas por 10 minutos e incubadas por outros 20, para garantir a homogeneidade da reação química e a liberação de bolhas. O sinal de luminescência foi então recuperado pelo aparelho e os dados brutos tratados para a produção do gráfico de viabilidade e a análise estatística.

#### 4.3.4. Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa)

O ensaio foi realizado no *Finnish Institute of Occupational Health* (FIOH), consoante metodologia padronizada e compartilhada pelo Dr. Hannu Norppa, e análoga à já consolidada e empregada em outros experimentos conduzidos pelo grupo por ele coordenado ([LINDBERG et al, 2009](#); [CATALÁN et al, 2014](#); [ROSZAK et al, 2016](#)). Foram conduzidos 2 experimentos independentes (repetição experimental), e cada qual com replicação biológica (2 replicatas por grupo; **controle negativo e 5 tratados com 25,6 a 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$** ) e replicação técnica (2 replicatas por poço), avaliando-se o dano ao ácido desoxirribonucleico em dois **pontos temporais** de exposição: **6 e 24 horas**.

As células em cultivo em fase de crescimento exponencial foram coletadas e os subcultivos estabelecidos em placas transparentes de poliestireno com 24 poços de fundo chato (Nunc, DK), com área de superfície de  $1,9 \text{ cm}^2$  e volume de trabalho 1 mL, perfazendo uma densidade inicial de  $10^4$  células. $\text{cm}^{-2}$ , mantidas em 1.000  $\mu\text{L}$  de meio LHC9. As placas foram incubadas ( $37^\circ\text{C}$ , 80% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ ) por até 36 horas previamente à exposição. Conferida a confluência, o meio de cada poço foi removido por aspiração, as dispersões de tratamento em meio LHC9 foram adicionadas (500  $\mu\text{L}$  por poço) e a exposição acompanhada diariamente até o momento de coleta.

Antes de se completar o respectivo tempo de exposição (10 minutos), os poços referentes aos controles positivos foram aspirados e tratados com 500  $\mu\text{L}$  de meio LHC9 acrescido de 3,1  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM, Perdrogen, Sigma-Aldrich, DE), por 10 minutos e em temperatura ambiente. Após isto, as dispersões de tratamento foram aspiradas, e cada poço foi lavado três vezes com DPBS a  $37^\circ\text{C}$ . O substrato foi digerido em 250  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina a 0,05% (p/v) - ácido etilenodiaminotetracético a 53 mM (1x; Gibco, Life Technologies, USA) por até 10 minutos, em incubadora. Confirmado o desprendimento celular, a enzima foi então neutralizada pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo RPMI 1640 [1x; (-)Glu; Gibco, Life Technologies, USA) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado por calor (1x; Gibco, Life Technologies, USA) e adicionado de antibióticos [Estreptomicina ( $10^4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) + Penicilina ( $10^4 \text{UI}.\text{ml}^{-1}$ ); HyClone, GE Healthcare Life Sciences, USA). O conteúdo de cada poço foi todo transferido para um tubo cônico de 15mL e centrifugado a 1.100 rotações por minuto, por 5 minutos e a  $4^\circ\text{C}$  (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, DE). Após, os tubos foram alocados em recipientes térmicos refrigerados e com isopropanol (Nalgene, USA) ou com gelo (Scotsman Frimont ice machine, S.p.A. Pogliano, IT). A partir deste ponto, todos os procedimentos sucedentes foram realizados sob luz amarela. O *pellet* foi então resuspendido em 1.000  $\mu\text{L}$  de ágar de baixo ponto de fusão (Merck KGaA, DE) a 0,75% em DPBS (p/v) e aquecido e equilibrado a  $37^\circ\text{C}$ ; uma alíquota de 60  $\mu\text{L}$  de cada poço foi colocada sobre lâmina de vidro (*frosted coupé edges*, Menzel GmbH, DE) previamente recoberta com ágar de ponto normal de fusão (Merck KGaA, DE) a 1,5% em DPBS (p/v); imediatamente após a sobreposição da alíquota contendo as células resuspendidas, esta foi espalhada na lâmina por meio de lamínula de vidro (24x40 cm, Menzel GmbH, DE); a lâmina foi então repousada sobre placa

metálica fria, por até 15 minutos, até que o ágar de baixo ponto de fusão fosse solidificado; as lamínulas foram então cuidadosamente removidas.

Concluído o preparo das lâminas, essas foram submergidas em solução hipertônica de lise por pelo menos uma hora e a 4°C. Para o preparo de cada lote de 1 L de solução, diluiu-se em água deionizada 146,1 g de NaCl (Merck KGaA, DE), 37,2 g de EDTA (Sigma-Aldrich, DE) e 1,2 g de base Trizma (Sigma-Aldrich, DE); o pH foi ajustado para 10 em um medidor calibrado em dois pontos (7 e 10) (Schott CG843, DE) pela adição de NaOH (Merck KGaA, DE) a 10N; a solução de lise foi então filtrada com filtro 0,2 µm em polietersulfona (VWR International LLC, USA) e armazenada; previamente ao uso, ela foi finalizada pela adição de detergente a 1% (v/v; Triton X-100, Sigma-Aldrich, DE).

Após a digestão, as lâminas foram transferidas para a placa de eletroforese (Scie-Plas-40, Scie-Plas, UK). Solução fresca de eletroforese foi preparada – para cada lote de 1L, diluiu-se em água deionizada a 4°C os volumes de 30 mL de solução estoque de NaOH a 10 N e 5mL de solução estoque de EDTA (Sigma-Aldrich, DE) a 200 mM e com pH 10. O pH da solução de eletroforese foi aferido para garantir índice superior a 13 (versão alcalina do ensaio do cometa). Cerca de 800 mL da solução eletroforética alcalina foi adicionado à placa, e as lâminas foram incubadas para o desenovelamento do ácido desoxirribonucleico, a 4°C, por 20 minutos. O volume da solução na placa então foi ajustado para perfazer um potencial de 27V (0,74 V.cm<sup>-1</sup>) e uma corrente de 300 mA. A eletroforese foi executada por 20 minutos, período após o qual as lâminas foram removidas da placa, e então neutralizadas por 5 minutos pelo gotejamento de solução tampão base Trizma a 0,4 M e pH 7,5, procedimento repetido por mais duas vezes. Após, as lâminas foram lavadas em água deionizada a 4°C e então fixadas por 5 minutos em etanol absoluto. As amostras foram coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (Continental Lab Products, USA) em água deionizada e filtrado (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>).

A avaliação dos nucleoides e cometas se deu em microscópio de fluorescência (Axioplan 2, Zeiss, DE) integrado a sistema semi-automático de análise de imagem (Komet 5.5, Andor Technology, UK).

#### 4.3.5. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese

O teste também foi conduzido no *Finnish Institute of Occupational Health* (FIOH), consoante metodologia padronizada pelo Dr. Hannu Norppa, e se optou pela técnica de cotratamento, conforme previamente relatado ([DOAK et al, 2012](#)). Foi realizado um experimento com replicação biológica (2 replicatas) para cada grupo (**controles negativo e positivo e 7 tratados com 25,6 a 256 µg.mL<sup>-1</sup>**), avaliando-se o dano cromossômico em um único **ponto temporal** de exposição total: **48 horas** (6 horas de tratamento só com o nanomaterial acrescido de mais 42 horas de cotratamento com a citocalasina B).

As células em cultivo em fase de crescimento exponencial foram coletadas e os subcultivos estabelecidos em sistema *chamber slide* em permanox (Lab-Tek II, Nunc, DK), com área de superfície de 4 cm<sup>2</sup> e volume de trabalho 2 mL, perfazendo uma densidade inicial de 10<sup>4</sup> células.cm<sup>-2</sup>, mantidas em 1.000 µL de meio LHC9. As placas foram incubadas (37°C, 80% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>) por até 36 horas previamente à exposição. Conferida a confluência, o meio de cada poço (câmara) foi removido por aspiração, e as dispersões de tratamento em meio LHC9 foram adicionadas (1.000 µL por poço). Foi empregada a mitomicina C (Sigma-Aldrich, DE) como substância de referência no grupo controle positivo; 15 ng foram aliquoteados de solução estoque do ativo diluídos e congelados em dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, DE) a 1% (p/v), e que foram dispersos em 1 mL de LHC9 e homogeneamente aplicados em cada subcultivo. Após 6 horas de tratamento, 9 µg do ativo bloqueador de citocinese, citocalasina B (Sigma-Aldrich, DE), diluídos e congelados em dimetilsulfóxido a 2% (p/v), foram dispersos nos 1 mL de LHC9 administrados no início da exposição, garantindo-se procedimento de homogeneização mecânica da dispersão.

A exposição foi acompanhada diariamente, até o momento de coleta, quando o sistema foi retirado da incubadora, as dispersões de tratamento removidas por aspiração, e cada câmara foi lavado três vezes com DPBS a 37°C. As câmaras de cada lâmina foram manualmente subtraídas; após secagem em ar ambiente dentro de fluxo laminar, elas foram fixadas por 10 minutos em metanol absoluto, e então armazenadas a -20°C.

Cada lâmina foi marcada com o fluoróforo nuclear 4'-6-diamidino-2-fenilindol (5 µg.mL<sup>-1</sup> em água deionizada e microfiltrada), lavada em água deionizada, secada em condição ambiente protegida da luz, hidratada com tampão de Sörensen (pH 6,8), coberta com lamínula e analisadas no laboratório do Departamento de Genética e Morfologia da

Universidade de Brasília (GEM/UnB), por meio de microscopia de fluorescência (Evos fl Auto, Thermo Fischer), com o respectivo filtro e aumento de 60x.

Ademais, completada a análise do micronúcleo e da proliferação celular, as lâminas foram: (1) coradas com solução padrão de eosina; e (2) tratadas para a detecção de ferro (aglomerados de nanopartículas) com azul da Prússia (ferrocianeto acidificado), e mantidas a 4°C.

#### 4.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão

Para cada nanomaterial foi coletada uma amostra representativa de células (**grupo controle e 5 tratados com 51,2 µg.mL<sup>-1</sup> por 6, 24 e 48 horas**), cultivada de forma homóloga à descrita para o ensaio do cometa. Após a coleta, as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS e centrifugadas a 1.100 rotações por minuto por 5 minutos a cada lavagem (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, DE), para a remoção do máximo possível de nanomaterial depositado; e então foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em PBS (v/v) por uma hora, lavadas e acondicionadas em microtubo em tampão PBS e mantidas refrigeradas a 4°C. Todos esses procedimentos foram realizados em fluxo laminar estéril e com troca das ponteiros a cada passo.

Por fim, as amostras foram processadas no Departamento de Biologia Celular - Universidade de Brasília, em cooperação com o grupo coordenado pela Profa. Dra. Sonia Nair Bão, seguindo o protocolo padrão do laboratório de microscopia. Cada amostra foi: centrifugadas (1.100 rotações por minuto por 5 minutos) e lavadas (3 vezes, com água deionizada); pós-fixadas com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio (1:1 v/v), no escuro, por 1 hora; lavada com água deionizada (1 vez); contração *in bloc* com acetato de uranila 0,5% (v/v) durante a noite, protegido da luz e refrigerado a 4°C; lavada com água deionizada (2 vezes); resuspensa progressivamente em acetona, sendo uma passagem de 10 minutos e uma resuspensão para cada uma das concentrações (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100%, em v/v); infiltração com resina Spurr, mediante passagens sucessivas de 6 horas para cada uma das misturas de acetona e resina (2:1, 1:1, 1:2 e 0:1, em v/v; a cada etapa, o *pellet* foi homogeneizado na fração de acetona antes da adição da fração de resina); polimerização em estufa, a 65°C por 3 dias. Os blocos então foram processados e as imagens obtidas em parceria.

#### 4.3.7. Análise estatística

Os conjuntos de dados observados em cada modalidade de ensaio ou de teste biológico foram descritos e analisados usando as ferramentas disponíveis no pacote especializado do programa *SPSS Statistics* - versão 20 (IBM).

Para o ensaio de viabilidade celular foram utilizados: o teste *t* de Student, para comparar os grupos controle; a análise de variância fatorial (ANOVA), seguida pelos testes de Dunnett e de Games-Howell (*post hoc*); a regressão probabilística (Probit), para a definição da maior concentração empregada nos ensaios de genotoxicidade (a causar uma redução da viabilidade de até 55% em relação ao controle negativo normalizado); e a análise de Tukey, para comparar o efeito em relação aos tempos de tratamento, quando assim tenha sido descrito nos resultados.

No ensaio do cometa, foram usados os mesmos testes citados acima, exceto o Probit; ainda, foi empregado o teste de correlação de Pearson, para análise da qualidade da replicação técnica das lâminas.

Por fim, no teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, a frequência de micronucleação foi comparada entre os grupos pelo teste do Qui-Quadrado, enquanto o efeito citotóxico (índice de proliferação com bloqueio da citocinese) foi analisado com o teste *t* de Student, para comparar os grupos controle, a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett (*post hoc*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização dos nanomateriais

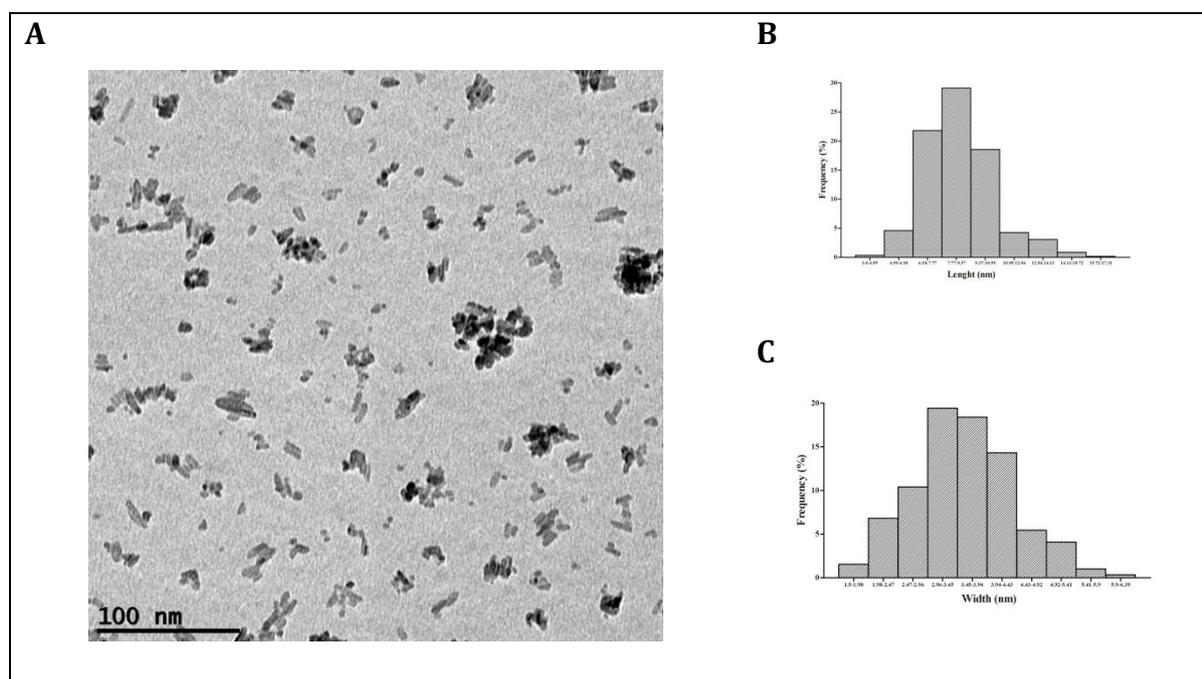
A **forma**, o **diâmetro primário**, o **diâmetro hidrodinâmico** e o **potencial zeta** dos nanomateriais estão resumidos nas **Tabelas 1-3**; todos são compostos por nanopartículas.

Na **Figura 21** e na **Tabela 1** estão dispostas a forma e as dimensões (largura e comprimento) das nanopartículas sintetizadas por **coprecipitação** e sem cobertura ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{Cp}$ ); a forma representativa é a de bastão; o comprimento variou entre 3,4 e 17,31 nm, com tendência central de  $3 \pm 0,6$  nm (média  $\pm$  desvio padrão); a largura variou entre 1,5 e 6,39 nm, com tendência central de  $8 \pm 1$  nm (média  $\pm$  desvio padrão). Ainda, posto que, na via de síntese, esse nanomaterial foi fracionado equitativamente em 3 partes do mesmo lote (1 parte mantida sem cobertura =  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{Cp}$  + 1 parte coberta com citrato =  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpCit}$  + 1 parte coberta com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico =  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpDmsa}$ ); e, assumindo-se que a microscopia eletrônica de transmissão, consoante a metodologia aplicada, não detecta as macromoléculas usadas nas coberturas, as propriedades morfológicas aqui descritas se aplicariam a todos esses 3 nanomateriais sintetizados conjuntamente.

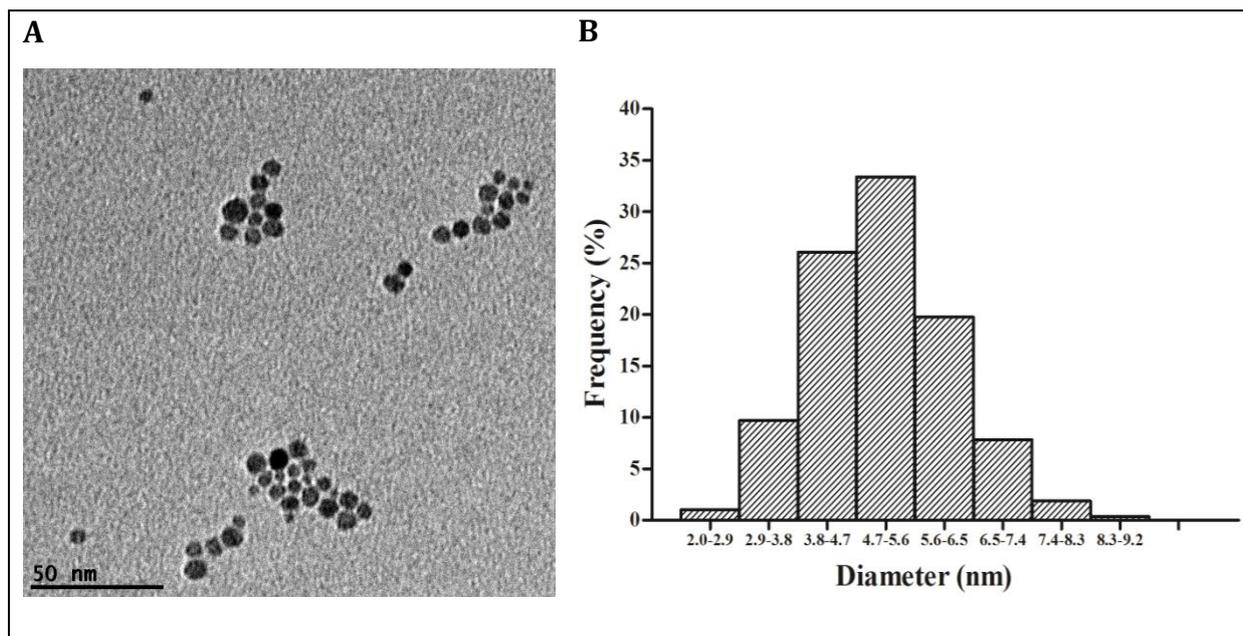
Nas **Figuras 22 e 23** e na **Tabela 1** estão dispostas a forma e o diâmetro primário das nanopartículas sintetizadas, separadamente, por **decomposição térmica**, e com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ); a forma representativa de ambas é a de esfera; o diâmetro da primeira (**Figura 22**) variou entre 2,00 e 9,2 nm, com tendência central de  $5 \pm 0,8$  nm (média  $\pm$  desvio padrão), enquanto que o diâmetro da segunda (**Figura 23**) variou entre 2,20 e 9,04 nm, com tendência central de  $5 \pm 0,9$  nm (média  $\pm$  desvio padrão).

Na **Tabela 2** o rastreamento de partículas individuais (*Nanotracking*) em água ultrapura descreveu a distribuição acumulada do diâmetro hidrodinâmico (10% e 90% do número de partículas contadas para cada nanomaterial) e a sua tendência central (média  $\pm$  desvio padrão). As nanopartículas sintetizadas por **coprecipitação** apresentaram:  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{Cp}$  – diâmetro entre 62,8 e 139,7 nm ( $101 \pm 7$ );  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpCit}$  – diâmetro entre 45,9 e 94,3 nm ( $74 \pm 3$ );  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpDmsa}$  – diâmetro entre  $102 \pm 4$  nm ( $101 \pm 7$ ). As sintetizadas por **decomposição térmica** tiveram:  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{TdCit}$  – diâmetro entre 67,1 e 158,2 nm ( $110 \pm 4$ );  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{TdDmsa}$  – diâmetro entre 94,3 e 264,2 nm ( $170 \pm 5$ ).

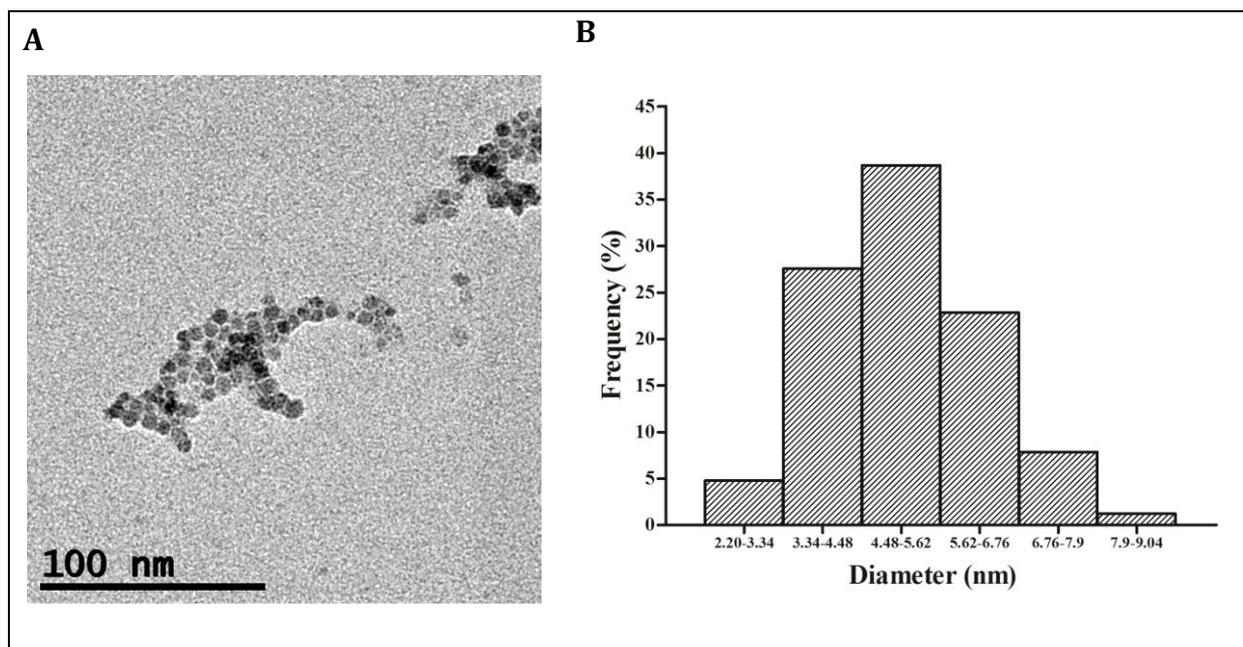
Adicionalmente, a **Tabela 3** compila o diâmetro hidrodinâmico (média  $\pm$  desvio padrão), o índice de polidispersão e a carga superficial dos nanomateriais, em diversos meios (água molecular; solução de água ultrapura e albumina sérica bovina a 0,05% p/v; ou mistura de solução de água ultrapura e albumina sérica bovina a 0,05% p/v com meio de cultivo celular). Em suma, o comportamento em água ultrapura e em solução de albumina foi análogo para todos os materiais, no que se refere à estabilidade do coloide (índice de polidispersão); nos nanomateriais obtidos por **coprecipitação** o diâmetro hidrodinâmico foi minimamente incrementado na presença de albumina; enquanto que, para os sintetizados por **decomposição térmica**, o efeito dessa adição foi influenciado pela cobertura, com aumento do diâmetro médio, quando a cobertura foi com citrato, ou sua redução, quando coberto com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico; e houve desestabilização dos coloides na presença adicional de meio de cultivo (LHC9). Quanto ao potencial zeta, houve uma variação mínima de 11mV (em módulo) na presença de albumina, independentemente do nanomaterial; não foi possível a mensuração da carga em cultivo, devido à desestabilização dos coloides comprometer o desempenho da mobilidade eletroforética (aglomeração).



**Figura 21.** Forma e dimensões primárias de nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{Cp}$ ). **(A)** Micrografia adquirida por microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a forma de bastão (largura média de  $8 \pm 1$  nm; comprimento médio de  $3 \pm 0,6$  nm). **(B)** Histograma de distribuição da largura. **(C)** Histograma de distribuição do comprimento. ( $n = 500$ ).



**Figura 22.** Forma e diâmetro primário de nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ). **(A)** Micrografia adquirida por microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a forma esférica (diâmetro médio de  $5 \pm 0,8$  nm). **(B)** Histograma de distribuição do diâmetro. ( $n = 500$ ).



**Figura 23.** Forma e diâmetro primário de nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ). **(A)** Micrografia adquirida por microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a forma esférica (diâmetro médio de  $5 \pm 0,9$  nm). **(B)** Histograma de distribuição do diâmetro. ( $n = 500$ ).

**Tabela 1.** Forma e dimensões de nanopartículas de ferrita de manganês caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Nanomaterial	Forma	Comprimento (nm)	Largura (nm)	Diâmetro (nm)
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - Cp	Bastão	8 ± 1	3 ± 0,6	-
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdCit	Esfera	-	-	5 ± 0,8
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdDmsa	Esfera	-	-	5 ± 0,9

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**); e (ii) decomposição térmica, com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). (-): não aplicável. Dados representados como média ± desvio padrão (n = 500).

**Tabela 2.** Diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas de ferrita de manganês caracterizado por rastreamento de partículas (*Nanotracking*).

Nanomaterial	D <sub>H</sub> (nm)	D <sub>H10</sub> (nm)	D <sub>H50</sub> (nm)	D <sub>H90</sub> (nm)
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - Cp	101 ± 7	62,8	90,9	139,7
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpCit	74 ± 3	45,9	65,6	94,3
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpDmsa	102 ± 4	60,5	88,2	140,5
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdCit	110 ± 4	67,1	94,5	158,2
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdDmsa	170 ± 5	94,3	146,3	264,2

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**) ou com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**); e (ii) decomposição térmica, com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). D<sub>H</sub>: diâmetro hidrodinâmico em água ultrapura. D<sub>H10</sub>, D<sub>H50</sub>, D<sub>H90</sub>: diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 10%, 50% e 90% das nanopartículas contadas. Dados representados como média ± desvio padrão, quando aplicável (em todos os casos, n = 3).

**Tabela 3.** Diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial zeta de nanopartículas de ferrita de manganês caracterizados por espalhamento da luz (*Zetasizer*).

Nanomaterial	D <sub>H</sub> H <sub>2</sub> O (nm)	PDI-H <sub>2</sub> O	D <sub>H</sub> BSA (nm)	PDI-BSA	D <sub>H</sub> LHC9 (nm) *	PDI-LHC9 *	ξ-H <sub>2</sub> O (mV)	ξ-BSA (mV)
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - Cp	80 ± 0	0,153	100 ± 1	0,148	2434	0,687	47 ± 1	32 ± 0
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpCit	47 ± 0	0,176	47 ± 1	0,175	1028	0,248	-46 ± 0	-29 ± 1
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpDmsa	79 ± 6	0,163	84 ± 2	0,168	2525	0,219	-50 ± 1	-30 ± 1
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdCit	155 ± 5	0,320	337 ± 28	0,389	204	0,352	-55 ± 1	-39 ± 0
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdDmsa	467 ± 9	0,444	354 ± 11	0,382	561	0,467	-33 ± 0	-22 ± 0

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**) ou com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**); e (ii) decomposição térmica, com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). D<sub>H</sub>H<sub>2</sub>O, PDI-H<sub>2</sub>O e ξ-H<sub>2</sub>O: diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta em água molecular (pH = 5,7). D<sub>H</sub>BSA, PDI-BSA e ξ-BSA: diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta em solução de albumina sérica bovina (pH ≈ 7). D<sub>H</sub>LHC9, PDI-LHC9: diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão em meio de cultivo celular (pH = 7,2). Dados representados como média ± desvio padrão, quando aplicável (n = 3, exceto para \* onde n = 1).

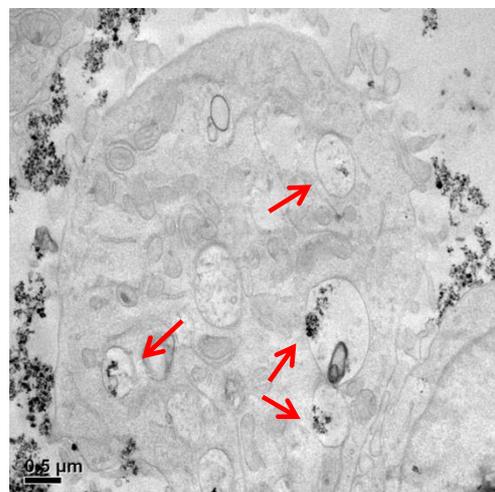
## 5.2. Internalização dos nanomateriais

A internalização de todos os nanomateriais está comprovada na **Figura 24**.

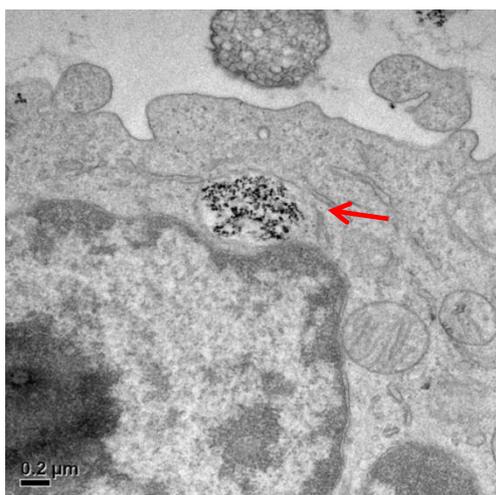
**Figura 24.** Micrografia eletrônica de transmissão de monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês, pelo tempo de 6 horas e concentração de 51,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As nanopartículas foram sintetizadas: (i) por coprecipitação, sem cobertura ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Cp}$ ), ou com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercapto-succínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpDmsa}$ ); (ii) por decomposição térmica, com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercapto-succínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ).

**Setas:** aglomerados de nanopartículas.

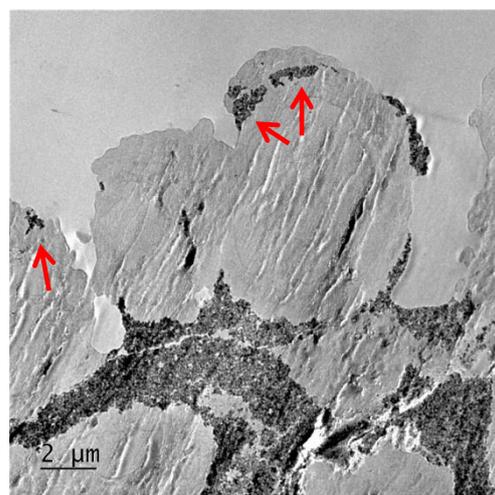
$\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Cp}$



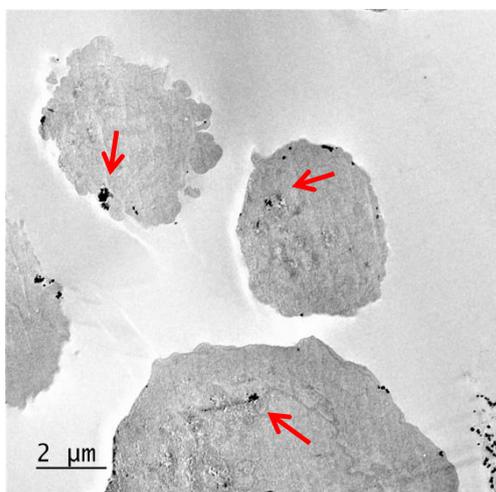
$\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpCit}$



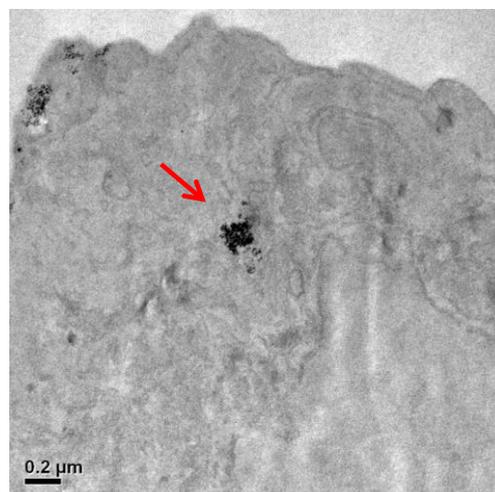
$\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpDmsa}$



$\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$



$\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$



### 5.3. Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina

Os resultados do ensaio luminométrico do trifosfato de adenosina (ATP) estão representados nas **Figuras (25-31)** e **Tabelas (4-5)** subsequentes e no **Apêndice 9.1 (Quadros 3-6)**; o efeito mensurado foi a luminosidade emitida pela população celular de cada unidade experimental (indicador da viabilidade celular), para cada nanomaterial e cobertura, e em função de um único fator ou de vários fatores, por meio de análise estatística fatorial: para a avaliação do efeito em relação ao fator “Concentração”, realizou-se a análise **monofatorial (ANOVA 1-Way)**; para os fatores “Concentração” e “Tempo”, a análise **bifatorial (ANOVA 2-Way)**; para os fatores “Tempo”, “Concentração”, “Cobertura” e “Síntese”, a análise **multifatorial (ANOVA 4-Way)**. Assim, por meio dessa modelagem, analisou-se como cada fator, isoladamente ou em interação com os demais, explicou, estatística e biologicamente, os resultados toxicológicos obtidos (citotoxicidade).

#### 5.3.1. Análise monofatorial (ANOVA 1-Way)

A análise monofatorial do fator “Concentração” indicou, respectivamente, que:

##### 5.3.1.1. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp*

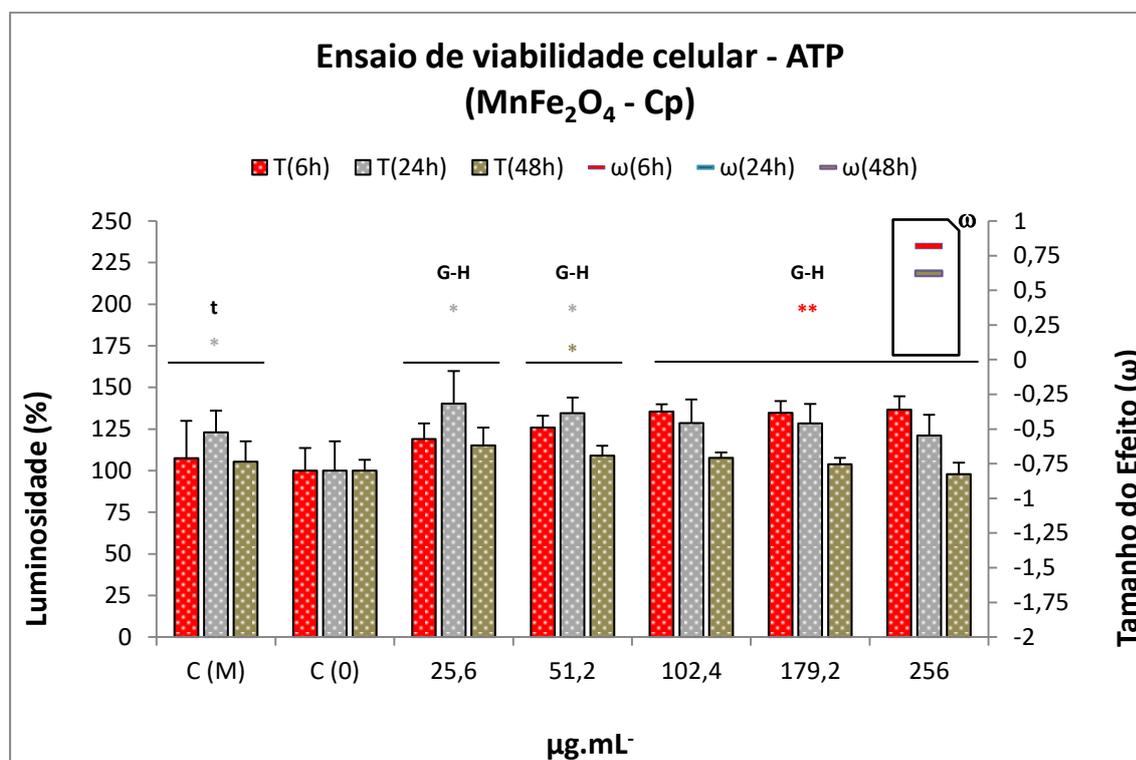
(i) na **Figura 25**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^M$  ( $107 \pm 22$ );  $C^0$  ( $100 \pm 13$ );  $t(10) = 0,700$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,22$ ] e **48 horas** [ $C^M$  ( $105 \pm 12$ );  $C^0$  ( $100 \pm 6$ );  $t(10) = 0,956$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,29$ ]; entretanto, a diferença significativa para **24 horas** [ $C^M$  ( $123 \pm 12$ );  $C^0$  ( $100 \pm 17$ );  $t(10) = 2,585$ ,  $p < 0,05$ ,  $r = 0,63$ ] decorreu do aumento da viabilidade celular e não teve relevância toxicológica;

(ii) na **Figura 25**, houve efeito estatisticamente significativo em todos os regimes, conforme o teste de Games-Howell, para as respectivas concentrações do nanomaterial - **6 horas**, 102,4 a 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,01$ ); **24 horas**, 25,6 e 51,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ); e **48 horas**, 51,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ); entretanto, em todos decorreu do aumento da viabilidade e não teve relevância toxicológica;

(iii) houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para os regimes de tratamento de – **6 horas** [ $F(1, 30) = 48,418$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,66$ ] e **48 horas** [ $F(1, 30) = 7,974$ ,  $p < 0,01$ ,  $\omega = 0,34$ ] –, devida ao aumento da

viabilidade e sem relevância toxicológica; mas não houve tendência para o de **24 horas** [ $F(1, 30) = 0,138, p > 0,05, \omega = 0,12$ ]; e

(iv) na **Figura 25**, como não houve concentração que causou uma redução de mais de 50% da viabilidade ( $IC_{50}$ ), para nenhum dos tempos, a concentração máxima para os ensaios de genotoxicidade foi fixada em  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 25.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $MnFe_2O_4Cp$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . C(M): grupo controle meio (LHC9); C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas. ω(6h), ω(24h) e ω(48h): tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %) e nos marcadores (tamanho do efeito, ω) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média ± desvio padrão (n = 6).

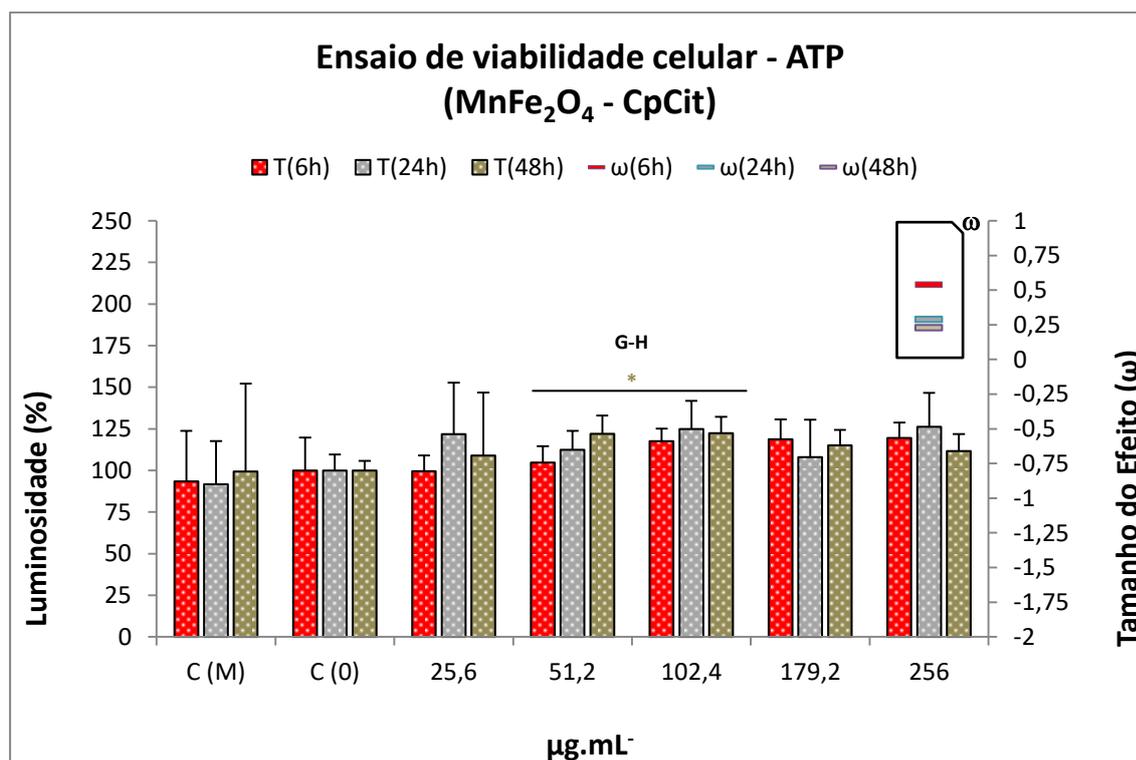
### 5.3.1.2. $MnFe_2O_4-CpCit$

(i) na **Figura 26**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para nenhum dos regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^M$  ( $93 \pm 30$ );  $C^0$  ( $100 \pm 19$ );  $t(10) = -0,439, p > 0,05, r = 0,14$ ]; **24 horas** [ $C^M$  ( $91 \pm 25$ );  $C^0$  ( $100 \pm 9$ );  $t(10) = -0,731, p > 0,05, r = 0,23$ ]; e **48 horas** [ $C^M$  ( $99 \pm 52$ );  $C^0$  ( $100 \pm 5$ );  $t(10) = -0,026, p > 0,05, r = 0,01$ ];

(ii) na **Figura 26**, não houve efeito estatisticamente significativo para os regimes de tratamento com o nanomaterial por **6 horas** ( $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,54$ ) e **24 horas** ( $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,29$ ), e a significância para **48 horas** ( $p < 0,05$ ,  $\omega = 0,23$ ) no teste de Games-Howell nas concentrações de 51,2 e 102,4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi sem relevância toxicológica e devida ao aumento da viabilidade celular;

(iii) houve tendência estatisticamente significativa para o termo linear da concentração em relação ao tempo **6 horas** [ $F(1, 30) = 15,528$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,54$ ], devida ao aumento sem relevância da viabilidade; não houve para os demais regimes – **24 horas** [ $F(1, 30) = 1,701$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,13$ ] e **48 horas** [ $F(1, 30) = 0,491$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,12$ ]; e

(iv) na **Figura 26**, como não houve concentração que causou uma redução de mais de 50% da viabilidade ( $\text{IC}_{50}$ ), para nenhum dos tempos, a concentração máxima para os ensaios de genotoxicidade foi fixada em 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 26.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{CpCit}$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . C(M): grupo controle meio (LHC9); C(O): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas.  $\omega(6h)$ ,  $\omega(24h)$  e  $\omega(48h)$ : tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %), nos marcadores (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ).

### 5.3.1.3. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa*

(i) na **Figura 27**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^M$  (95 ± 16);  $C^0$  (100 ± 7);  $t(10) = -0,531$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,17$ ] e **24 horas** [ $C^M$  (93 ± 27);  $C^0$  (100 ± 15);  $t(10) = -0,537$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,17$ ]; entretanto, a diferença significativa para **48 horas** [ $C^M$  (124 ± 5);  $C^0$  (100 ± 7);  $t(10) = 6,395$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,90$ ] decorreu do aumento da viabilidade celular e não teve relevância toxicológica;

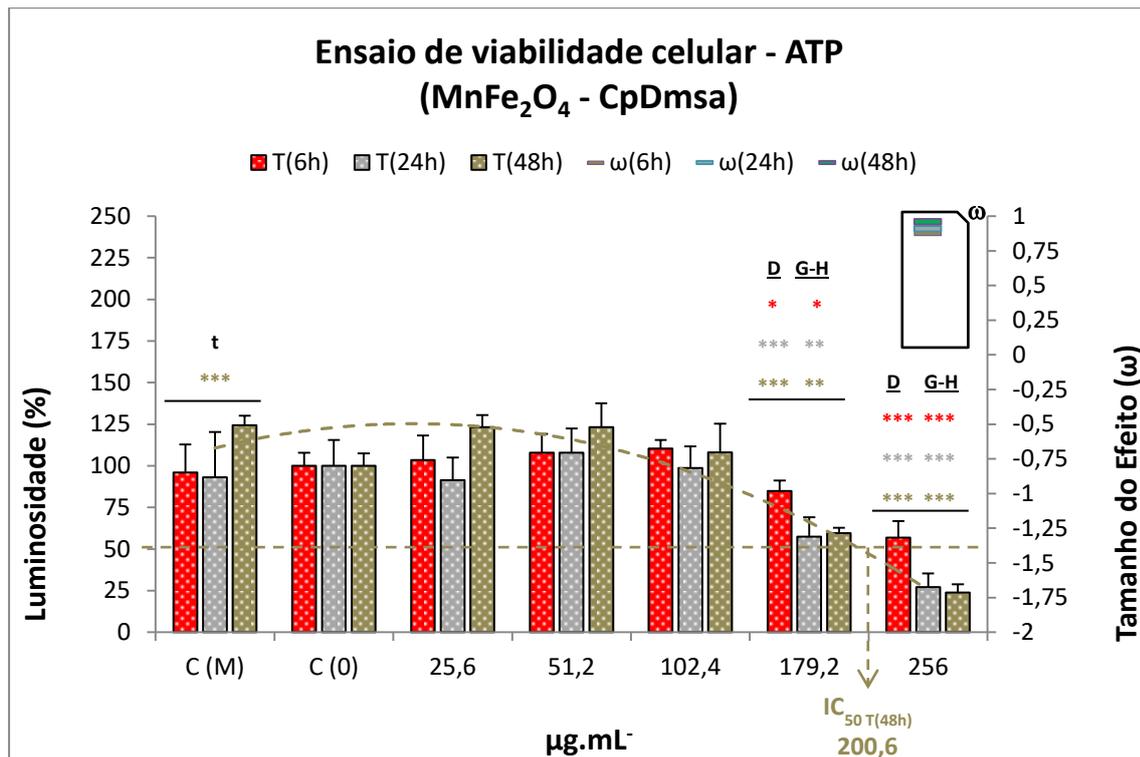
(ii) na **Figura 27**, houve redução significativa da viabilidade em todos os regimes de tratamento, conforme os testes Dunnett ou Games-Howell, para as respectivas concentrações do nanomaterial – **6 horas**, 179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ) e 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ); **24 horas**, 179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ) e 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ); e **48 horas**, 179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ) e 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ); essas reduções da viabilidade foram de relevância toxicológica;

(iii) houve tendência estatisticamente significativa para o termo linear da concentração em todos os regimes de tratamento, decorrente da redução da viabilidade e de relevância toxicológica – **6 horas** [ $F(1, 30) = 93,553$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,76$ ], **24 horas** [ $F(1, 30) = 148,278$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,84$ ] e **48 horas** [ $F(1, 30) = 363,094$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,88$ ]; e

(iv) na **Figura 27**, a análise da regressão probabilística (Probit) fixou o intervalo da concentração máxima de tratamento (50% ± 5%) para os ensaios de genotoxicidade entre 189,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (IC<sub>45</sub>) e 211,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (IC<sub>55</sub>), a partir do corte pelo tempo de tratamento que causou o maior efeito tóxico, isto é, 48 horas.

### 5.3.1.4. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit*

(i) na **Figura 28**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para todos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^M$  (93 ± 30);  $C^0$  (100 ± 19);  $t(10) = -0,439$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,14$ ], **24 horas** [ $C^M$  (91 ± 25);  $C^0$  (100 ± 9);  $t(10) = -0,731$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,23$ ] e **48 horas** [ $C^M$  (99 ± 52);  $C^0$  (100 ± 5);  $t(10) = -0,026$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,01$ ];



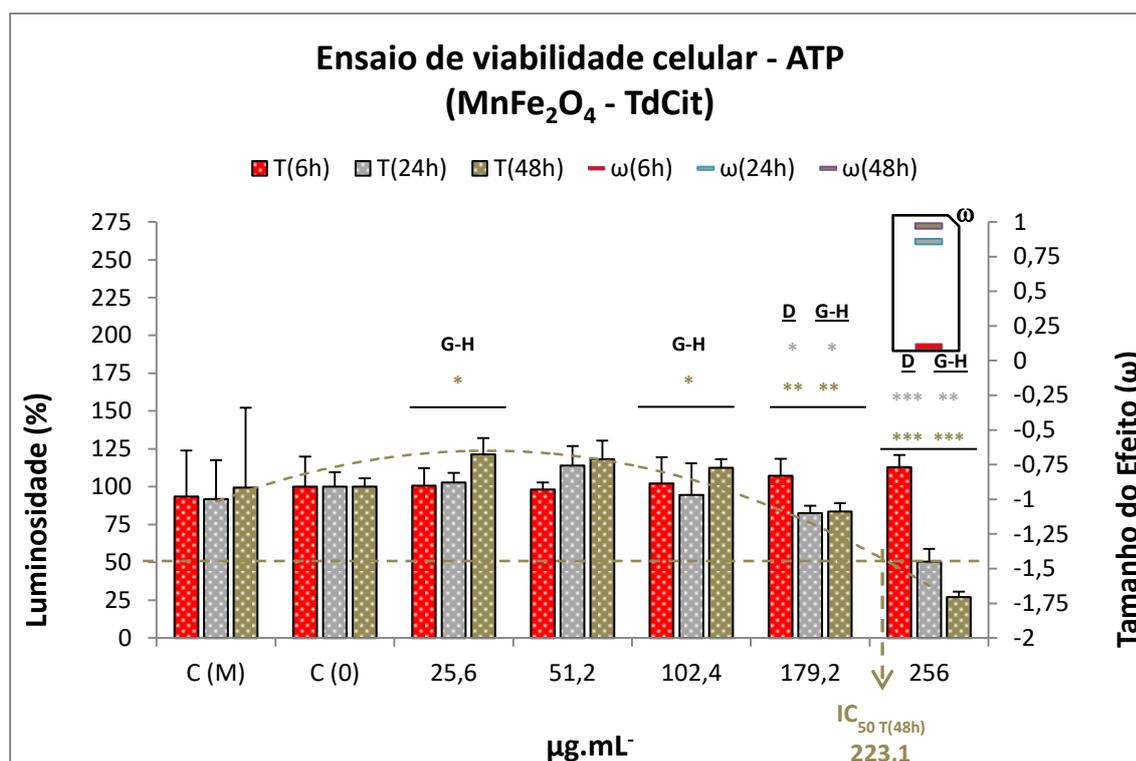
**Figura 27.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpDmsa), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256 µg.mL<sup>-1</sup>. C(M): grupo controle meio (LHC9); C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas. ω(6h), ω(24h) e ω(48h): tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. t: estatisticamente significativo no teste *t* de Student. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. D: estatisticamente significativo no teste de Dunnett. IC<sub>50 T(48h)</sub>: concentração que causou uma redução de 50% da luminosidade após 48 horas, calculada pelo teste Probit. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %), nos marcadores (tamanho do efeito, ω), no Probit (IC) e na significância estatística (\* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média ± desvio padrão (*n* = 6).

(ii) na **Figura 28**, não houve efeito estatisticamente significativo para o regime de tratamento com o nanomaterial por **6 horas**; mas houve para os demais, nas respectivas concentrações, conforme os testes de Dunnett ou Games-Howell - **24 horas**, 179,2 µg.mL<sup>-1</sup> (*p* < 0,05) e 256 µg.mL<sup>-1</sup> (*p* < 0,001 ou *p* < 0,01), devido à redução da viabilidade; e **48 horas**, 25,6 e 102,4 µg.mL<sup>-1</sup> (*p* < 0,05), sem relevância e devido ao aumento da viabilidade, e 179,2 e 256 µg.mL<sup>-1</sup> (*p* < 0,01 ou *p* < 0,001), por causa da redução da viabilidade; essas reduções da viabilidade foram de relevância toxicológica;

(iii) houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para os seguintes regimes de tratamento, devido à redução da viabilidade e toxicologicamente relevante - **24 horas** [*F*(1, 30) = 87,158, *p* < 0,001, ω = 0,79]

e **48 horas** [ $F(1, 30) = 459,232, p < 0,001, \omega = 0,84$ ]; mas não foi toxicologicamente relevante para **6 horas** [ $F(1, 30) = 4,868, p < 0,05, \omega = 0,33$ ]; e

(iv) na **Figura 28**, a análise da regressão probabilística (Probit) fixou o intervalo da concentração máxima de tratamento ( $50\% \pm 5\%$ ) para os ensaios de genotoxicidade entre  $213,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $IC_{45}$ ) e  $233,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $IC_{55}$ ), a partir do corte pelo tempo de tratamento que causou o maior efeito tóxico, isto é, 48 horas.



**Figura 28.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{TdCit}$ ), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . C(M): grupo controle meio (LHC9); C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas.  $\omega(6h)$ ,  $\omega(24h)$  e  $\omega(48h)$ : tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. D: estatisticamente significativo no teste de Dunnett.  $IC_{50 T(48h)}$ : concentração que causou uma redução de 50% da luminosidade após 48 horas, calculada pelo teste Probit. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %), nos marcadores (tamanho do efeito,  $\omega$ ), no Probit (IC) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ).

#### 5.3.1.5. $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$

(i) na **Figura 29**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, para os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^M$  ( $95 \pm 16$ );  $C^0$  ( $100 \pm 7$ );  $t(10) = -0,531, p > 0,05, r = 0,17$ ] e **24 horas** [ $C^M$  ( $93 \pm 27$ );  $C^0$  ( $100 \pm 15$ );  $t(10) = -0,537, p > 0,05, r = 0,17$ ];

entretanto, a diferença significativa para **48 horas** [ $C^M$  ( $124 \pm 5$ );  $C^0$  ( $100 \pm 7$ );  $t(10) = 6,395$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,90$ ], deveu-se ao aumento da viabilidade e não teve significado toxicológico;

(ii) na **Figura 29**, não houve efeito estatisticamente significativo para os regimes de tratamento com o nanomaterial por **6 horas** e **24 horas**; porém, houve redução significativa e toxicologicamente relevante da viabilidade para o regime de **48 horas**, conforme os testes de Dunnett e de Games-Howell, na concentração de  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p < 0,01$ );

(iii) houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para os regimes de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 30) = 21,148$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,61$ ], devido ao aumento da viabilidade e sem relevância toxicológica, e **48 horas** [ $F(1, 30) = 54,826$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,61$ ], por causa da redução toxicologicamente relevante da viabilidade; mas não houve tendência para o termo linear no de **24 horas** [ $F(1, 30) = 0,417$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,13$ ]; e

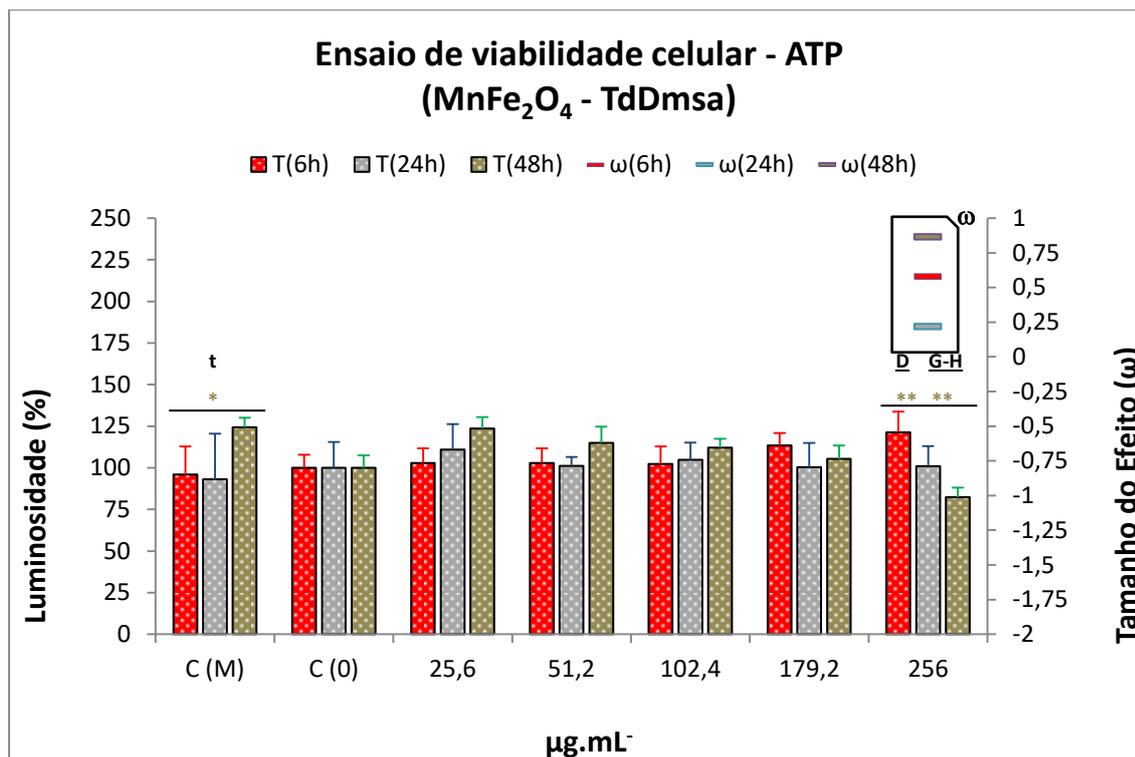
(iv) na **Figura 29**, como não houve concentração que causou uma redução de mais de 50% da viabilidade ( $IC_{50}$ ), para nenhum dos tempos, a concentração máxima para os ensaios de genotoxicidade foi fixada em  $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 5.3.1.6. Citrato (Cit)

(i) na **Figura 30**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para nenhum dos regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^M$  ( $101 \pm 41$ );  $C^0$  ( $100 \pm 17$ );  $t(6) = 0,051$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,02$ ], **24 horas** [ $C^M$  ( $97 \pm 33$ );  $C^0$  ( $100 \pm 4$ );  $t(6) = -0,149$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,06$ ] e **48 horas** [ $C^M$  ( $113 \pm 47$ );  $C^0$  ( $100 \pm 6$ );  $t(6) = 0,550$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,22$ ];

(ii) na **Figura 30**, não houve efeito estatisticamente significativo para nenhum dos regimes de tratamento com a cobertura (**6, 24 e 48 horas**);

(iii) não houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para nenhum regime de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 18) = 1,246$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,11$ ], **24 horas** [ $F(1, 18) = 0,744$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,10$ ] e **48 horas** [ $F(1, 18) = 0,741$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,10$ ]; e

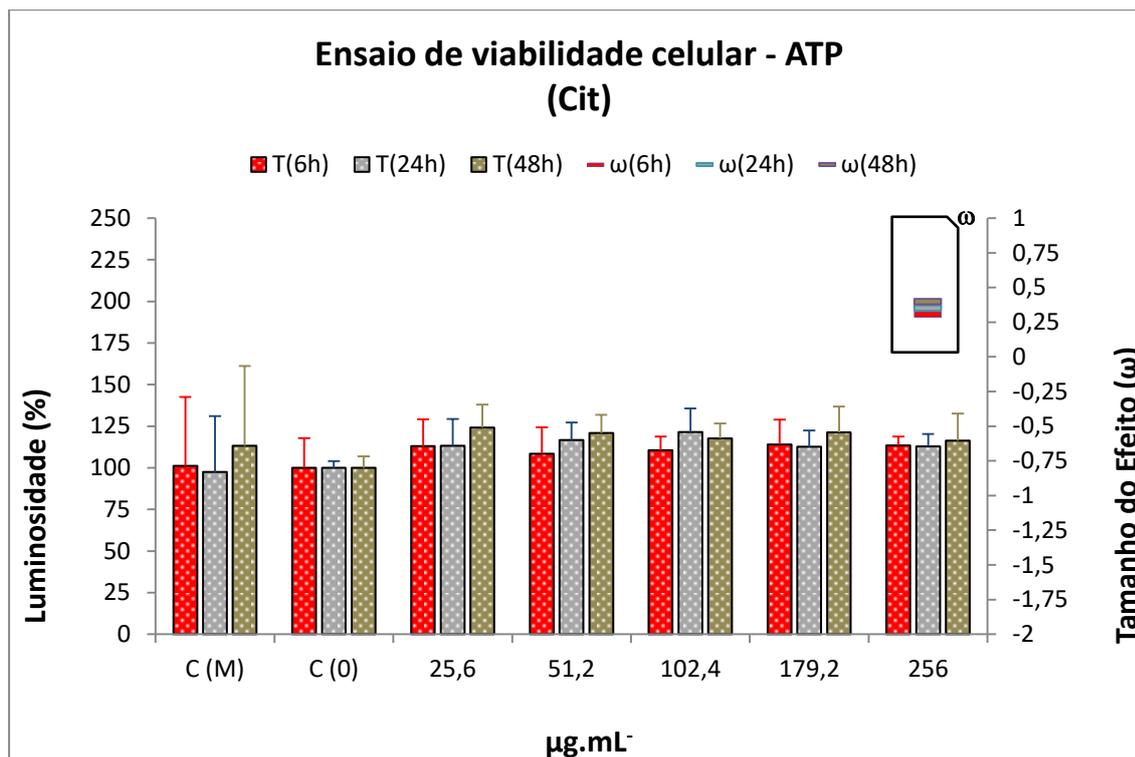


**Figura 29.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdDmsa), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256 µg.mL<sup>-1</sup>. C(M): grupo controle meio (LHC9); C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas. ω(6h), ω(24h) e ω(48h): tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. D: estatisticamente significativo no teste de Dunnett. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %), nos marcadores (tamanho do efeito, ω) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média ± desvio padrão (n = 6).

(iv) na **Figura 30**, apesar de não ter ocorrido concentração que causou uma redução de 50% da viabilidade (IC<sub>50</sub>), para nenhum dos tempos, a concentração máxima para os ensaios de genotoxicidade foi fixada em 102,4 µg.mL<sup>-1</sup>, em conformidade com o valor determinado para o ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa; vide seção a seguir).

#### 5.3.1.7. Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa)

(i) na **Figura 31**, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para os regimes de tratamento – **6 horas** [C<sup>M</sup> (97 ± 18); C<sup>0</sup> (100 ± 8);  $t(6) = -0,261$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,11$ ] e **24 horas** [C<sup>M</sup> (94 ± 33); C<sup>0</sup> (100 ± 17);  $t(6) = -0,292$ ,  $p > 0,05$ ,  $r = 0,12$ ]; e a diferença significativa para **48 horas** [C<sup>M</sup> (128 ± 5); C<sup>0</sup> (100 ± 7);  $t(6) = 6,107$ ,  $p < 0,01$ ,  $r = 0,93$ ], decorreu do aumento da viabilidade e sem relevância toxicológica;



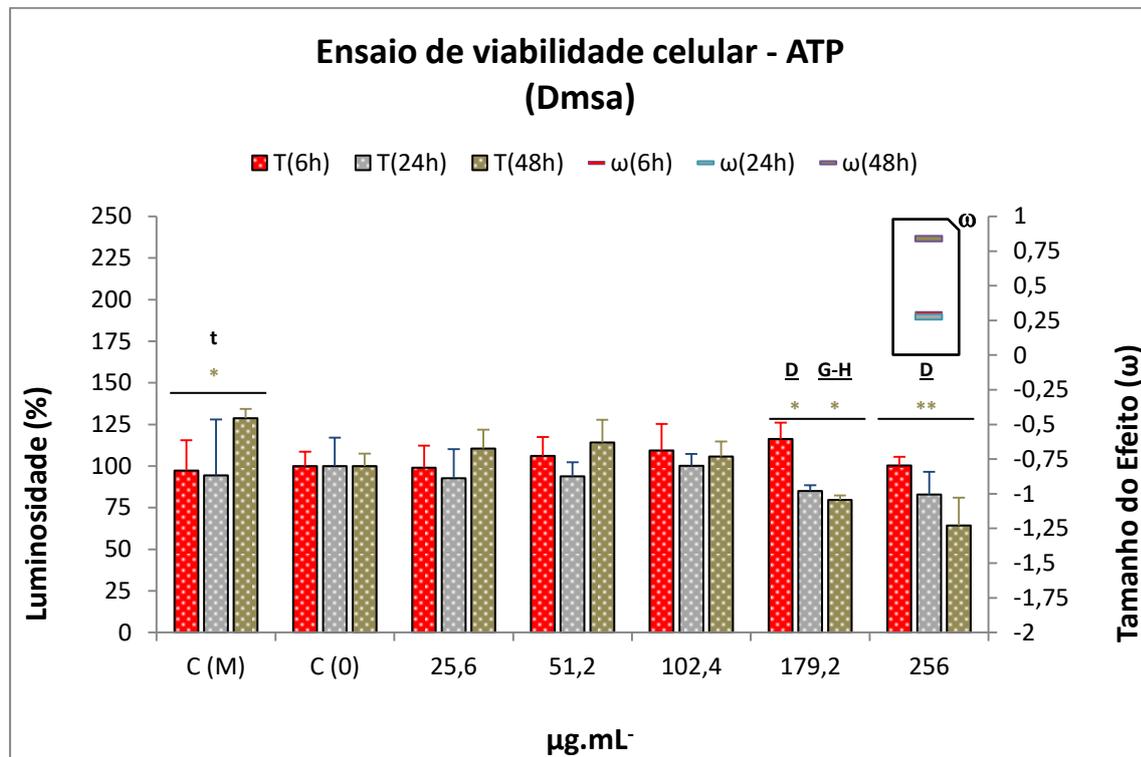
**Figura 30.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com citrato (Cit), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256 µg.mL<sup>-1</sup>. C(M): grupo controle meio (LHC9); C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas. ω(6h), ω(24h) e ω(48h): tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %) e nos marcadores (tamanho do efeito, ω) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média ± desvio padrão (n = 6).

(ii) na **Figura 31**, não houve efeito estatisticamente significativo para os regimes de tratamento com a cobertura por **6 horas** e **24 horas**, e o efeito estatisticamente significativo para **48 horas**, pelos testes de Dunnett e de Games-Howell, nas concentrações de 179,2 µg.mL<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ) e 256 µg.mL<sup>-1</sup> ( $p < 0,01$ ), decorreu da redução toxicologicamente relevante da viabilidade;

(iii) não houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para o regime de tratamento de **6 horas** [ $F(1, 18) = 0,744$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,10$ ]; e a tendência significativa tanto para **24 horas** [ $F(1, 18) = 4,564$ ,  $p < 0,05$ ,  $\omega = 0,37$ ] quanto para **48 horas** [ $F(1, 18) = 49,638$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,77$ ] foi significativa e de relevância toxicológica; e

(iv) na **Figura 31**, apesar de não ter ocorrido concentração que causou uma redução de 50% da viabilidade (IC<sub>50</sub>), para nenhum dos tempos, a concentração máxima para os ensaios

de genotoxicidade foi fixada em  $102,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , isto é, aquela na qual não houve nenhum efeito da cobertura, no intuito de se excluí-la como fator confundidor.



**Figura 31.** Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa), pelo tempo de 6 a 48 horas e concentração de 25,6 a 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . C(M): grupo controle meio (LHC9); C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). T(6h), T(24h) e T(48h): efeito após 6, 24 e 48 horas.  $\omega(6h)$ ,  $\omega(24h)$  e  $\omega(48h)$ : tamanho do efeito após 6, 24 e 48 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. D: estatisticamente significativo no teste de Dunnett. Os resultados descritos nas colunas (luminosidade, %), nos marcadores (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ).

### 5.3.2. Análise bifatorial (ANOVA 2-Way)

A análise bifatorial para os fatores “Concentração” e “Tempo” demonstrou, no modelo – (i) a participação individual do fator “Concentração”; (ii) a participação individual do fator “Tempo”; (iii) a interação dos fatores “Concentração e Tempo”; e (iv) a decomposição do fator “Tempo” somado a sua interação com o fator “Concentração”, para indicar como esses atuaram em cada grupo do fator “Concentração” –, conforme descrito na **Tabela 4**:

(i) o fator “**Concentração**” foi estatisticamente significativo para todos os nanomateriais e ambas as coberturas; para vários desses – **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit** [ $F(5, 90) = 3,701$ ,  $p < 0,01$ ,  $\omega = 0,26$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** [ $F(5, 90) = 14,481$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega = 0,43$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**

[ $F(5, 90) = 3,414, p < 0,01, \omega = 0,22$ ; vide item “iv – d” abaixo] e **Citrato** [ $F(5, 54) = 3,257, p < 0,05, \omega = 0,30$ ], esse efeito refletiu um aumento da viabilidade celular, considerado como um achado biológico irrelevante; enquanto que, para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $F(5, 90) = 131,821, p < 0,001, \omega = 0,85$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $F(5, 90) = 43,310, p < 0,001, \omega = 0,58$ ] e **Dmsa** [ $F(5, 54) = 6,55, p < 0,001, \omega = 0,38$ ], estão correlacionados com redução da viabilidade celular (citotoxicidade);

(ii) o fator “**Tempo**” foi estatisticamente significativo e apontou redução relevante da viabilidade celular para alguns nanomateriais – **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $F(2, 90) = 13,829, p < 0,001, \omega = 0,17$ ], após 24 horas, em comparação a ambos os tempos de 6 (Tukey:  $p < 0,001$ ) e de 48 horas (Tukey:  $p < 0,01$ ); **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $F(2, 90) = 12,966, p < 0,001, \omega = 0,20$ ], após 24 horas (Tukey:  $p < 0,001$ ) e 48 horas (Tukey:  $p < 0,01$ ), em comparação com o tempo de 6 horas; **Dmsa** [ $F(2, 54) = 7,837, p < 0,01, \omega = 0,27$ ], após 24 horas (Tukey:  $p < 0,01$ ) e 48 horas (Tukey:  $p < 0,05$ ), em comparação com o tempo de 6 horas; por outro lado, para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** [ $F(2, 90) = 42,106, p < 0,001, \omega = 0,47$ ], após 48 horas, em comparação a 6 e 24 horas (Tukey:  $p < 0,001$ , para ambos; vide item “iv – b” abaixo), essa redução não foi toxicologicamente relevante;

(iii) na **interação** dos fatores “Concentração e Tempo”, houve diferenças estatísticas significativas para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $F(10, 90) = 6,295, p < 0,001, \omega = 0,24$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** [ $F(10, 90) = 4,590, p < 0,001, \omega = 0,31$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $F(10, 90) = 21,496, p < 0,001, \omega = 0,57$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa** [ $F(10, 90) = 6,872, p < 0,001, \omega = 0,48$ ] e **Dmsa** [ $F(10, 54) = 3,946, p < 0,001, \omega = 0,39$ ];

(iv) na decomposição do fator “**Tempo**”, acrescido de sua interação com o fator “Concentração”, notou-se:

a) ausência de significado estatístico para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $F(12, 95) = 0,960, p > 0,05$ ]; isso porque o fator “Tempo” e o fator “Concentração” foram importantes separadamente, mas o tamanho do efeito para o fator “Concentração” sobrepôs o do fator “Tempo” ( $\approx 5x$ ), de modo que, estatisticamente, o fator “Tempo” não conseguiu afetar cada concentração de modo diferente; mas, consoante os dados, o tempo foi toxicologicamente relevante para as concentrações de **179,2** e **256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$** ;

b) diferença estatística significativa para todos os grupos tratados com **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** – **25,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 5,770, p < 0,01, \omega = 0,24$ ], **51,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 5,280, p < 0,01, \omega =$

0,23], **102,4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 6,590, p < 0,01, \omega = 0,25$ ], **179,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 8,430, p < 0,001, \omega = 0,29$ ], **256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 11,980, p < 0,001, \omega = 0,33$ ]; a análise horizontal dos dados da viabilidade celular indicou que tais grupos tiveram aumento no parâmetro quando comparados ao respectivo grupo controle temporalizado, mas a análise vertical deste mesmo parâmetro (dentro do mesmo tempo - 6h, 24h ou 48h) apontou que houve redução da viabilidade, mesmo que os valores de tal parâmetro estivessem próximos do controle; esse achado foi considerado sem relevância toxicológica;

c) diminuição da viabilidade celular para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**, na concentração de **256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 29,54, p < 0,001, \omega = 0,49$ ]; isto é, o fator “Tempo” e sua interação com o fator “Concentração” são relevantes toxicologicamente, especialmente para a maior concentração de tratamento;

d) diferença estatística significativa para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**, nas concentrações de **25,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 5,640, p < 0,01, \omega = 0,24$ ] e **256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 95) = 19,780, p < 0,001, \omega = 0,42$ ]; houve uma tendência de aumento da viabilidade celular para a menor concentração, mas de redução para a maior concentração (e de importância toxicológica); isto é, o fator “Tempo” não é significativo, mas por causa de sua interação com o fator “Concentração”, ele afetou esses dois grupos de forma diferente;

e) redução da viabilidade estatisticamente significativa para **Dmsa** nas concentrações de **179,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 59) = 7,950, p < 0,01, \omega = 0,28$ ] e de **256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$**  [ $F(2, 59) = 6,580, p < 0,01, \omega = 0,25$ ]; assim, o fator “Tempo” e sua interação com o fator “Concentração” são relevantes toxicologicamente, notadamente para as maiores concentrações de tratamento;

(v) vale ressaltar que, para **Citrato** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**, o efeito da interação dos fatores não foi estatisticamente significativo - [ $F(12, 59) = 0,490, p > 0,05, \omega = 0,23$ ] e [ $F(10, 90) = 1,068, p > 0,05, \omega = 0,06$ ] -, respectivamente; e, quando o efeito do fator “Tempo”, acrescido de sua interação com o fator “Concentração”, foi decomposto para cada grupo tratado com **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**, não houve significado estatístico [ $F(12, 95) = 0,920, p > 0,05$ ]; logo, avaliando-se os fatores “Concentração” e “Tempo” separadamente ou em interação, essa nanopartícula apresentou melhor viabilidade e comportamento semelhante ao **Citrato**.

**Tabela 4.** Análise bifatorial para os fatores “Concentração” e “Tempo” (ANOVA 2-Way) no ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

Fonte de Variação	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> CpCit		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> CpDmsa		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cp		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> TdCit		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> TdDmsa		Cit		Dmsa	
	<i>p</i>	<i>ω</i>	<i>p</i>	<i>ω</i>	<i>p</i>	<i>ω</i>	<i>p</i>	<i>ω</i>	<i>p</i>	<i>ω</i>	<i>p</i>	<i>ω</i>	<i>p</i>	<i>ω</i>
Modelo														
Concentração	0,004	0,26	0,000	0,85	0,000	0,43	0,000	0,58	0,007	0,22	0,012	0,30	0,000	0,38
Tempo	0,377	0,01	0,000	0,17	0,000	0,47	0,000	0,20	0,194	0,07	0,178	0,11	0,001	0,27
Concentração ∩ Tempo	0,395	0,06	0,000	0,24	0,000	0,31	0,000	0,57	0,000	0,48	0,966	0,23	0,000	0,39
Concentração + Tempo	0,527	-	0,495	-	0,000	-	0,000	-	0,000	-	0,915	-	0,002	-
Tempo ∩ C <sup>0</sup>	1,000	0,00	1,000	0,00	1,000	0,00	1,000	0,00	1,000	0,00	1,000	0,00	1,000	0,00
Tempo ∩ 25,6 µg.mL-	0,104	0,15	0,212	0,13	0,004	0,24	0,145	0,14	0,005	0,24	0,428	0,09	0,201	0,13
Tempo ∩ 51,2 µg.mL-	0,249	0,12	0,621	0,07	0,007	0,23	0,191	0,13	0,058	0,17	0,427	0,09	0,127	0,15
Tempo ∩ 102,4 µg.mL-	0,781	0,05	0,787	0,05	0,002	0,25	0,304	0,11	0,265	0,12	0,524	0,08	0,649	0,07
Tempo ∩ 179,2 µg.mL-	0,574	0,08	0,244	0,12	0,000	0,29	0,058	0,17	0,109	0,15	0,629	0,07	0,001	0,28
Tempo ∩ 256 µg.mL-	0,371	0,10	0,139	0,14	0,000	0,33	0,000	0,49	0,000	0,42	0,932	0,03	0,003	0,25

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp) ou com cobertura de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa); e (ii) decomposição térmica, com cobertura de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa). **Cit**: citrato. **Dmsa**: ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **p**: significância. **ω**: tamanho do efeito. ∩: interação ou decomposição de fatores. (+): fator acrescido de sua interação com outro fator.  : fonte de variação sem relevância toxicológica.  : fonte de variação com relevância toxicológica.

### 5.3.3. Análise multifatorial (ANOVA 4-Way)

A análise multifatorial para os fatores “Concentração”, “Tempo”, “Cobertura” e “Síntese” demonstrou, no modelo – (i) a participação individual de cada um desses fatores; (ii) a interação entre esses fatores; e (iii) a decomposição de cada fator e de sua interação com outro (interações bifatoriais), para indicar como esses atuaram dentro do respectivo fator com o qual houve a interação –, conforme descrito na **Tabela 5**:

(i) os fatores “**Concentração**” [ $F(5, 360) = 64,253, p < 0,001$ ], “**Tempo**” [ $F(2, 360) = 8,804, p < 0,001$ ] e “**Cobertura**” [ $F(1, 360) = 41,269, p < 0,001$ ] foram estatisticamente e toxicologicamente significativos, enquanto que o fator “**Síntese**” [ $F(1, 360) = 0,054, p > 0,05$ ], sozinho, não influenciou a viabilidade celular;

(ii) o fator “**Tempo**” [ $F(2, 360) = 8,804, p < 0,001$ ] indicou a redução toxicologicamente relevante da viabilidade celular após **24 horas** (Tukey:  $p < 0,001$ ) em comparação com o tempo de **6 horas**;

(iii) a interação dos fatores “**Concentração e Tempo**” foi estatisticamente significativa [ $F(10, 360) = 19,714, p < 0,001$ ]; e a decomposição do fator “**Tempo**”, acrescido de sua interação com o fator “**Concentração**”, apontou aumento da viabilidade celular na concentração de **25,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(2, 419) = 3,61, p < 0,05$ ], sem relevância toxicológica, e redução toxicologicamente relevante nas concentrações de **179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(2, 419) = 4,43, p < 0,05$ ] e **256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(2, 419) = 19,270, p < 0,001$ ];

(iv) a interação dos fatores “**Concentração e Cobertura**” foi estatisticamente significativa [ $F(5, 360) = 10,031, p < 0,001$ ]; e a decomposição do fator “**Cobertura**”, acrescido de sua interação com o fator “**Concentração**”, indicou a redução toxicologicamente relevante da viabilidade para as concentrações de **179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(1, 425) = 7,63, p < 0,01$ ] e **256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(1, 425) = 15,72, p < 0,001$ ];

(v) a interação dos fatores “**Concentração e Síntese**” foi estatisticamente significativa [ $F(5, 360) = 4,506, p < 0,01$ ]; e a decomposição do fator “**Síntese**”, acrescido de sua interação com o fator “**Concentração**”, não apontou significância para nenhum dos grupos tratados e não indicou qualquer relevância toxicológica da via de síntese em relação à concentração;

(vi) a interação dos fatores “**Síntese e Cobertura**” foi estatisticamente significativa [ $F(1, 360) = 203,165, p < 0,001$ ]; e a decomposição do fator “**Cobertura**”, acrescido de sua

interação com o fator “Síntese”, indicou que a cobertura foi toxicologicamente relevante para ambas as vias – **Coprecipitação** [ $F(1, 429) = 64,59, p < 0,001$ ] e **Decomposição Térmica** [ $F(1, 429) = 9,26, p < 0,01$ ];

(vii) a interação dos fatores “**Síntese e Tempo**” não foi estatisticamente significativa [ $F(2, 429) = 1,618, p > 0,05$ ]; e a decomposição do fator “**Tempo**”, acrescido de sua interação com o fator “Síntese”, não indicou qualquer relevância toxicológica do tempo em relação à via de síntese; e

(viii) também foram significativas as seguintes interações trinomiais - “**Concentração e Síntese e Cobertura**” [ $F(5, 427) = 67,369, p < 0,001$ ]; “**Concentração e Síntese e Tempo**” [ $F(10, 427) = 3,556, p < 0,001$ ]; e “**Síntese e Cobertura e Tempo**” [ $F(2, 427) = 11,103, p < 0,001$ ] -, indicando que, apesar da via de síntese, isoladamente, não ser relevante, ela interage significativamente com todos os demais fatores para produzir os efeitos biológicos observados.

**Tabela 5.** Análise multifatorial para os fatores “Tempo”, “Concentração”, “Cobertura” e “Síntese” (ANOVA 4-Way) no ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

	Fatoração	0 µg.mL <sup>-1</sup>	25,6 µg.mL <sup>-1</sup>	51,2 µg.mL <sup>-1</sup>	102,4 µg.mL <sup>-1</sup>	179,2 µg.mL <sup>-1</sup>	256 µg.mL <sup>-1</sup>
<b>Fonte de Variação</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
Concentração	0,000	-	-	-	-	-	-
Tempo	0,000	-	-	-	-	-	-
Cobertura	0,000	-	-	-	-	-	-
Síntese	0,816	-	-	-	-	-	-
Concentração ∩ Tempo	0,000	-	-	-	-	-	-
Concentração + Tempo	0,000	1,000	0,028	0,052	0,474	0,012	0,000
Concentração ∩ Cobertura	0,000	-	-	-	-	-	-
Concentração + Cobertura	0,000	1,000	0,995	0,728	0,268	0,006	0,000
Concentração ∩ Síntese	0,001	-	-	-	-	-	-
Concentração + Síntese	0,442	1,000	0,693	0,413	0,126	0,164	0,395
	Fatoração	Cp	Td	Cit	Dmsa	-	-
<b>Fonte de Variação</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	-	-
Tempo ∩ Cobertura	0,099	-	-	-	-	-	-
Tempo + Cobertura	0,217	-	-	0,626	0,090	-	-
Síntese ∩ Cobertura	0,000	-	-	-	-	-	-
Síntese + Cobertura	0,000	0,000	0,002	-	-	-	-
Síntese ∩ Tempo	0,200	-	-	-	-	-	-
Síntese + Tempo	0,249	0,571	0,118	-	-	-	-

**p:** significância. **∩:** interação de fatores. **(+):** decomposição de um fator acrescido de sua interação com outro fator. **Cp:** síntese por coprecipitação. **Td:** síntese por decomposição térmica. **Cit:** cobertura de citrato. **Dmsa:** cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico.  : fonte de variação sem relevância toxicológica.  : fonte de variação com relevância toxicológica.

#### 5.4. Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa)

Os resultados do ensaio do cometa estão representados nas **Figuras (32-38)** e **Tabelas (6-7)** subsequentes e no **Apêndice 9.2 (Quadros 7-14)**; o efeito mensurado foi a intensidade da cauda do cometa (% DNA na cauda; marcador de dano no ácido desoxirribonucleico), para cada nanomaterial e cobertura, e em função de um único ou de vários fatores, por meio de análise estatística fatorial: para a avaliação do efeito em relação ao fator “Concentração”, realizou-se a análise **monofatorial (ANOVA 1-Way)**; para os fatores “Concentração e Tempo” ou “Concentração e Experimento”, a análise **bifatorial (ANOVA 2-Way)**; para os fatores “Tempo”, “Concentração”, “Cobertura” e “Síntese”, a análise **multifatorial (ANOVA 4-Way)**. Assim, por meio dessa modelagem, analisou-se como cada fator, isoladamente ou em interação com os demais, explicou, estatística e biologicamente, os resultados toxicológicos obtidos (genotoxicidade).

##### 5.4.1. Análise monofatorial (ANOVA 1-Way)

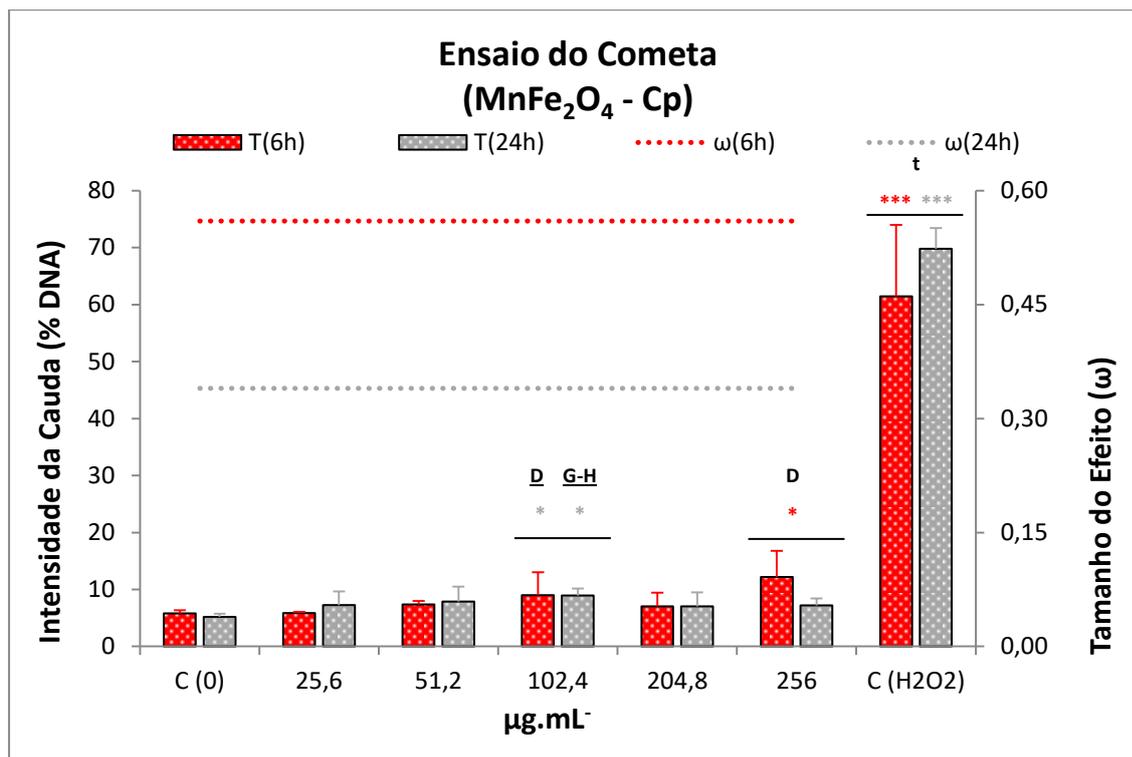
A análise monofatorial do fator “Concentração” indicou, respectivamente, que:

##### 5.4.1.1. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp*

(i) na **Figura 32**, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $61 \pm 12$ );  $C^0$  ( $5 \pm 0$ );  $t(6) = 8,831$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,96$ ] e **24 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $69 \pm 3$ );  $C^0$  ( $5 \pm 0$ );  $t(6) = 35,043$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 1,00$ ];

(ii) na **Figura 32**, houve aumento estatística e toxicologicamente relevante da fragmentação do ácido desoxirribonucleico, pelos testes de Dunnett ou Games-Howell, para ambos os regimes – **6 horas** [ $F(5, 18) = 3,176$ ,  $p < 0,05$ ,  $\omega = 0,56$ ] para a concentração de **256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  ( $p < 0,05$ ); e **24 horas** [ $F(5, 18) = 1,645$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,34$ ] para a concentração de **102,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  ( $p < 0,05$ ); e

(iii) houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para o regime de tratamento por **6 horas** [ $F(1, 18) = 10,673$ ,  $p < 0,01$ ,  $\omega = 0,53$ ], devido ao aumento da fragmentação do ácido desoxirribonucleico, mas não para o tratamento com exposição por **24 horas** [ $F(1, 18) = 1,702$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,16$ ].



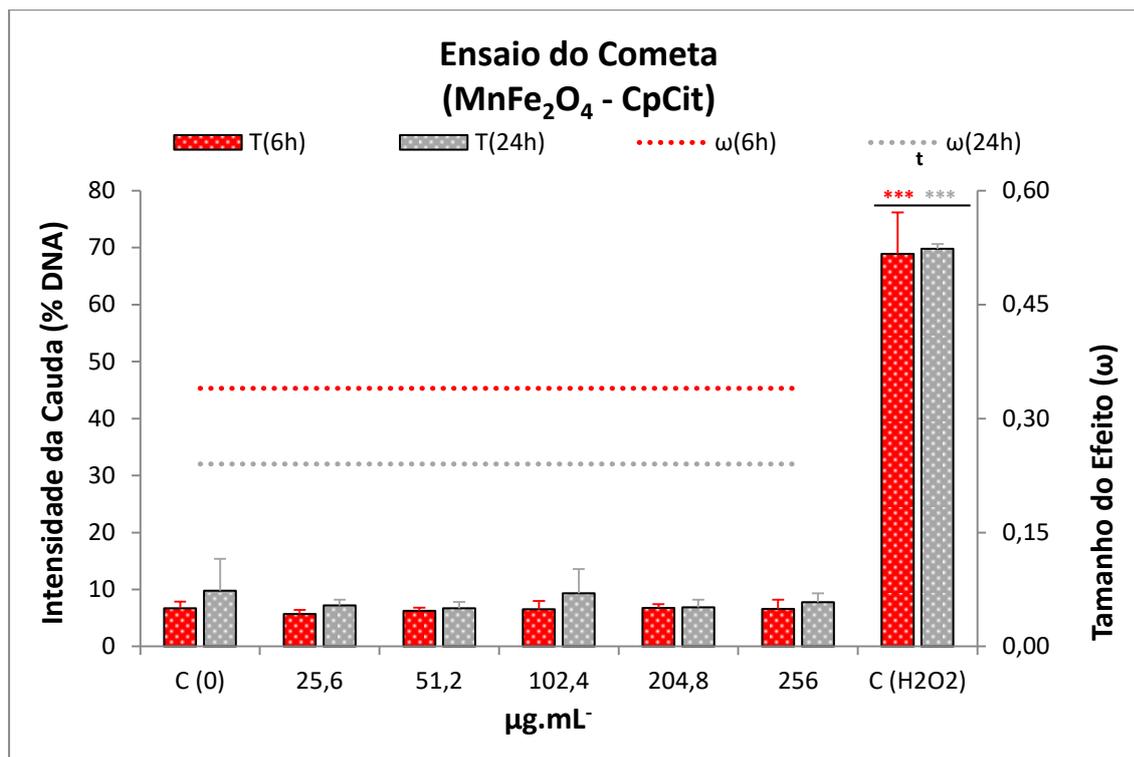
**Figura 32.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $MnFe_2O_4Cp$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 256  $\mu g.mL^{-1}$ . C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas.  $\omega(6h)$  e  $\omega(24h)$ : tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. G-H: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. D: estatisticamente significativo no teste de Dunnett. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

#### 5.4.1.2. $MnFe_2O_4-CpCit$

(i) na **Figura 33**, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $68 \pm 7$ );  $C^0$  ( $6 \pm 1$ );  $t(6) = 16,968$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ] e **24 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $69 \pm 0$ );  $C^0$  ( $9 \pm 5$ );  $t(6) = 21,105$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ];

(ii) na **Figura 33**, não houve efeito estatisticamente significativo para nenhum regime de tratamento com o nanomaterial – **6 horas** [ $F(5, 18) = 0,513$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,34$ ] e **24 horas** [ $F(5, 18) = 0,736$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,24$ ]; e

(iii) não houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para nenhum regime de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 18) = 0,401$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,17$ ] e **24 horas** [ $F(1, 18) = 0,441$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,16$ ].



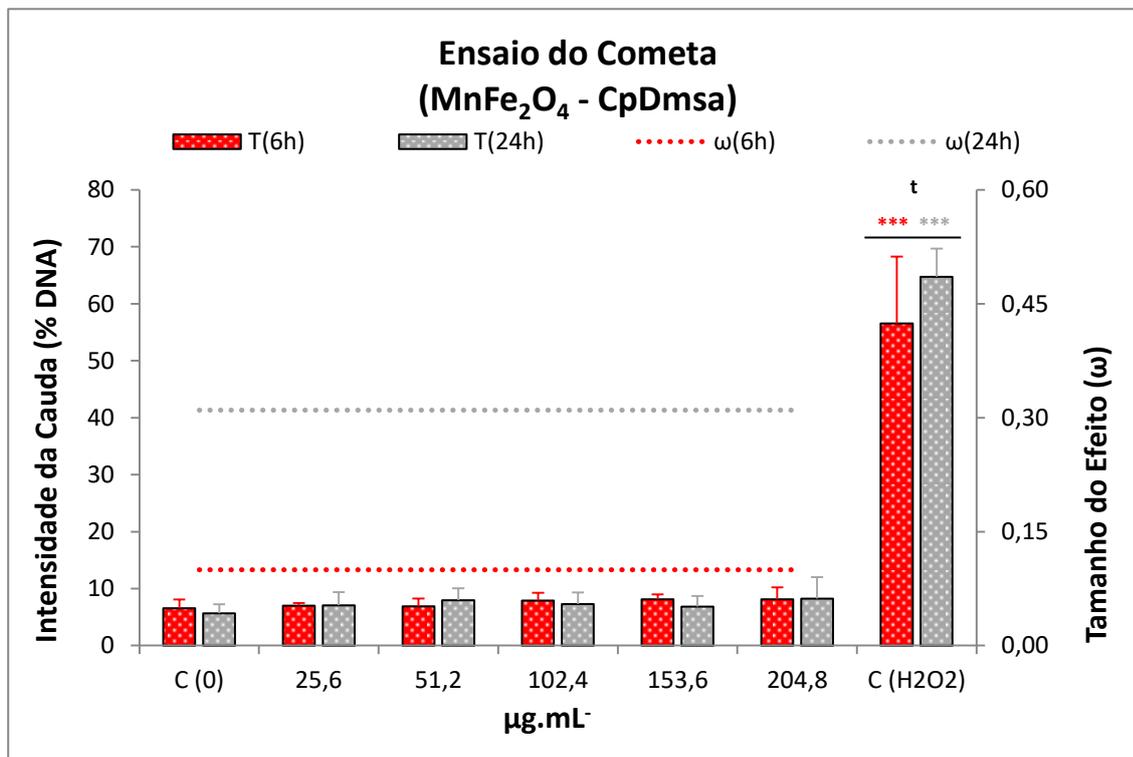
**Figura 33.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de citrato ( $MnFe_2O_4CpCit$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 256  $\mu g.mL^{-1}$ . C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas.  $\omega$ (6h) e  $\omega$ (24h): tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*\*\*)  $p < 0,001$  apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

#### 5.4.1.3. $MnFe_2O_4-CpDmsa$

(i) na **Figura 34**, houve diferença estatística significativa entre os grupos controle para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $56 \pm 11$ );  $C^0$  ( $6 \pm 1$ );  $t(6) = 8,436$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,96$ ] e **24 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $64 \pm 4$ );  $C^0$  ( $5 \pm 1$ );  $t(6) = 22,878$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ];

(ii) na **Figura 34**, não houve efeito estatisticamente significativo para nenhum regime de tratamento com o nanomaterial – **6 horas** [ $F(5, 18) = 1,053$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,10$ ] e **24 horas** [ $F(5, 18) = 0,587$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,31$ ]; e

(iii) houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear, para o regime de tratamento por **6 horas** [ $F(1, 18) = 4,641$ ,  $p < 0,05$ ,  $\omega = 0,39$ ], devido ao aumento da fragmentação do ácido desoxirribonucleico, mas não por **24 horas** [ $F(1, 18) = 1,358$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,13$ ].



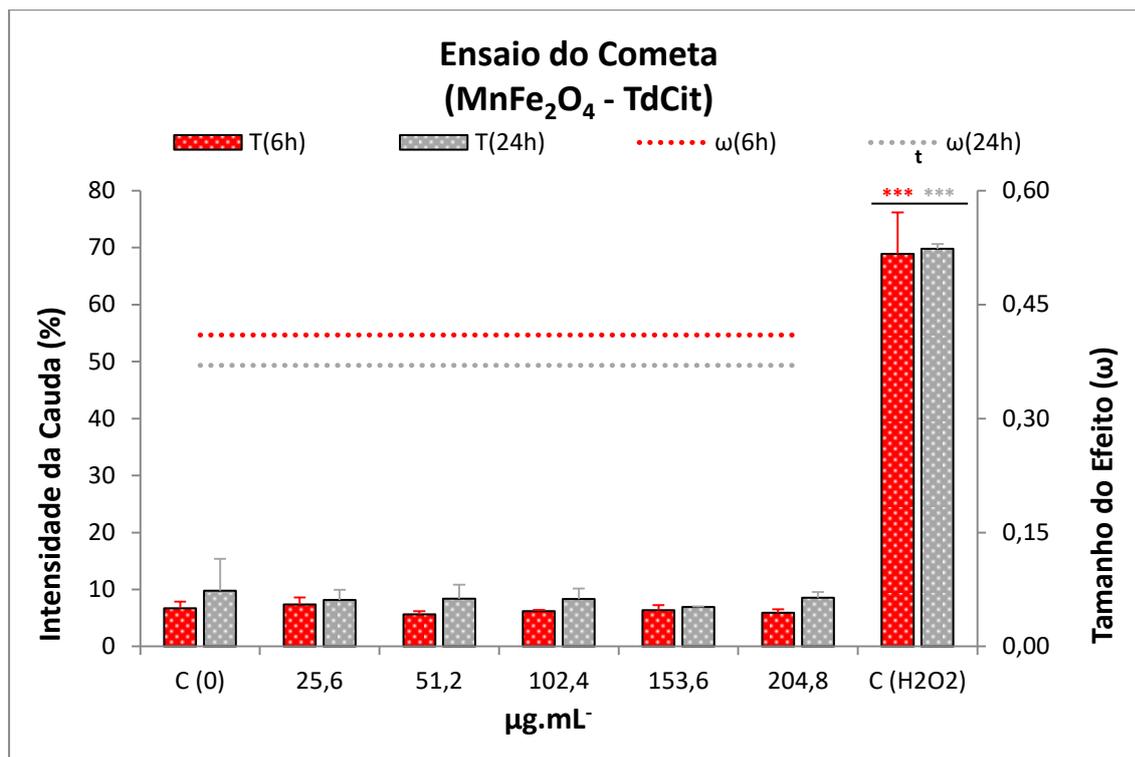
**Figura 34.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $MnFe_2O_4CpDmsa$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 204,8  $\mu g.mL^{-1}$ . C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C( $H_2O_2$ ): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas.  $\omega(6h)$  e  $\omega(24h)$ : tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*\*\*) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

#### 5.4.1.4. $MnFe_2O_4$ -TdCit

(i) na **Figura 35**, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $68 \pm 7$ );  $C^0$  ( $6 \pm 1$ );  $t(6) = 16,968$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ], e **24 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $69 \pm 0$ );  $C^0$  ( $9 \pm 5$ );  $t(6) = 21,105$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ];

(ii) na **Figura 35**, não houve efeito estatisticamente significativo para nenhum regime de tratamento com o nanomaterial – **6 horas** [ $F(5, 18) = 1,957$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,41$ ] e **24 horas** [ $F(5, 18) = 0,434$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,37$ ]; e

(iii) não houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para nenhum regime de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 18) = 3,014$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,26$ ] e **24 horas** [ $F(1, 18) = 0,729$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,11$ ].



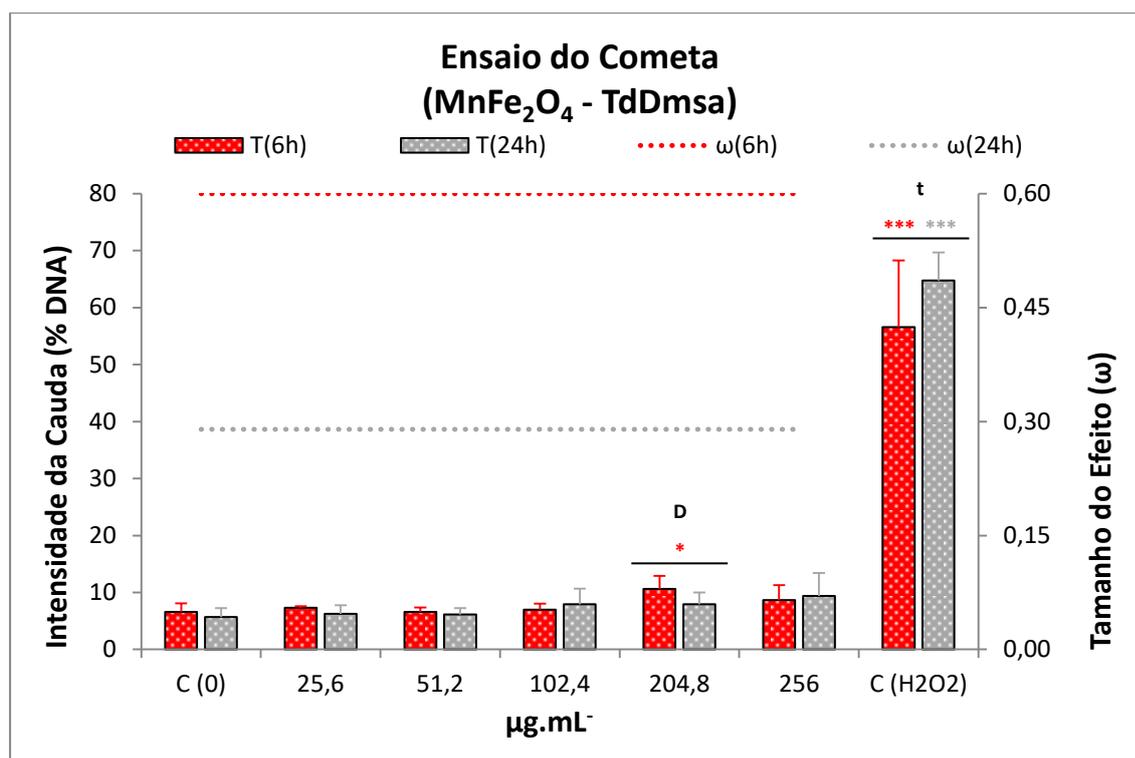
**Figura 35.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de citrato ( $MnFe_2O_4$ -TdCit), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 204,8  $\mu g.mL^{-1}$ . C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas.  $\omega$ (6h) e  $\omega$ (24h): tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*\*\*)  $p < 0,001$  apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

#### 5.4.1.5. $MnFe_2O_4$ -TdDmsa

(i) na **Figura 36**, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $56 \pm 11$ );  $C^0$  ( $6 \pm 1$ );  $t(6) = 8,436$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,96$ ] e **24 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $64 \pm 4$ );  $C^0$  ( $5 \pm 1$ );  $t(6) = 22,878$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ];

(ii) na **Figura 36**, houve aumento estatística e toxicologicamente relevante da fragmentação do ácido desoxirribonucleico pelo, pelo teste de Dunnett, para o regime de **6 horas** [ $F(5, 18) = 3,718$ ,  $p < 0,05$ ,  $\omega = 0,60$ ] para a concentração de **204,8  $\mu g.mL^{-1}$**  ( $p < 0,05$ ), mas não para o regime de **24 horas** [ $F(5, 18) = 1,433$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,29$ ]; e

(iii) houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear, devido ao aumento da fragmentação do ácido desoxirribonucleico, para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 18) = 8,935$ ,  $p < 0,01$ ,  $\omega = 0,46$ ] e **24 horas** [ $F(1, 18) = 6,453$ ,  $p < 0,05$ ,  $\omega = 0,46$ ].



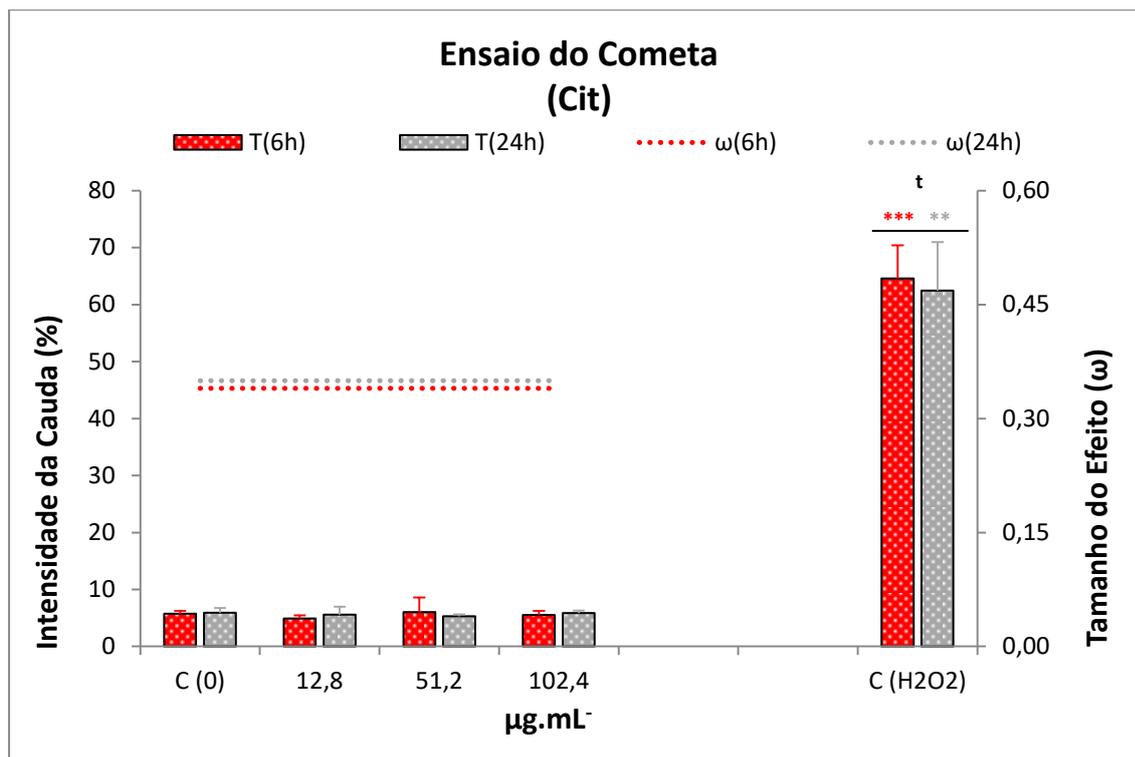
**Figura 36.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica e com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{TdDmsa}$ ), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas.  $\omega(6h)$  e  $\omega(24h)$ : tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. D: estatisticamente significativo no teste de Dunnett. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

#### 5.4.1.6. Citrato (Cit)

(i) na **Figura 37**, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para ambos os regimes de tratamento – **6 horas** [ $\text{C}^{\text{H}_2\text{O}_2}$  ( $64 \pm 5$ );  $\text{C}^0$  ( $5 \pm 0$ );  $t(6) = 20,275$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ] e **24 horas** [ $\text{C}^{\text{H}_2\text{O}_2}$  ( $62 \pm 8$ );  $\text{C}^0$  ( $5 \pm 0$ );  $t(6) = 13,157$ ,  $p < 0,01$ ,  $r = 0,98$ ];

(ii) na **Figura 37**, não houve efeito estatisticamente significativo para nenhum regime de tratamento com o citrato – **6 horas** [ $F(3, 12) = 0,456$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,34$ ] e **24 horas** [ $F(3, 12) = 0,412$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,35$ ]; e

(iii) não houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para nenhum regime de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 12) = 0,012$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,26$ ] e **24 horas** [ $F(1, 12) = 0,042$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,26$ ].



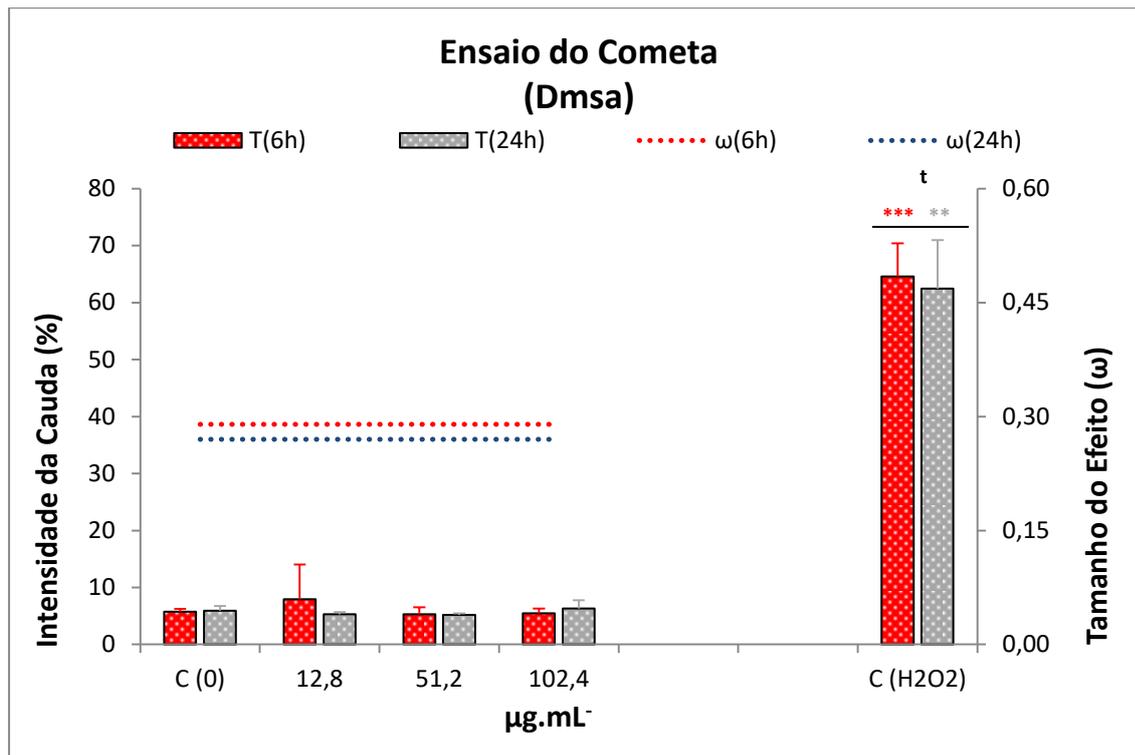
**Figura 37.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com citrato (Cit), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 102,4 µg.mL<sup>-1</sup>. C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas. ω(6h) e ω(24h): tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito, ω) e na significância estatística (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média ± desvio padrão (n = 4).

#### 5.4.1.7. Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa)

(i) na **Figura 38**, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle para todos os regimes de tratamento — **6 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $64 \pm 5$ );  $C^0$  ( $5 \pm 0$ );  $t(6) = 20,275$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,99$ ] e **24 horas** [ $C^H_2O_2$  ( $62 \pm 8$ );  $C^0$  ( $5 \pm 0$ );  $t(6) = 13,157$ ,  $p < 0,01$ ,  $r = 0,98$ ];

(ii) na **Figura 38**, não houve efeito estatisticamente significativo para nenhum regime de tratamento com o ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico – **6 horas** [ $F(3, 12) = 0,597$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,29$ ] e **24 horas** [ $F(3, 12) = 1,420$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,27$ ]; e

(iii) não houve tendência estatisticamente significativa do efeito em relação à concentração para o termo linear para nenhum regime de tratamento – **6 horas** [ $F(1, 12) = 0,243$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,14$ ] e **24 horas** [ $F(1, 12) = 0,286$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,20$ ].



**Figura 38.** Ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa), pelo tempo de 6 a 24 horas e concentração de 25,6 a 102,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . C(0): grupo controle negativo (LHC9 + solução de albumina). C(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): grupo controle positivo (LHC9 + solução de peróxido de hidrogênio). T(6h) e T(24h): efeito após 6 e 24 horas.  $\omega$ (6h) e  $\omega$ (24h): tamanho do efeito após 6 e 24 horas. t: estatisticamente significativo no teste t de Student. Os resultados descritos nas colunas (intensidade da cauda, %DNA), nas linhas (tamanho do efeito,  $\omega$ ) e na significância estatística (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) apresentam as mesmas cores para o respectivo tempo. Dados representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 4$ ).

#### 5.4.2. Análise bifatorial (ANOVA 2-Way)

As análises bifatoriais para os fatores (“Concentração” e “Tempo”) ou (“Concentração” e “Experimento”) demonstrou, no modelo – (i) a participação individual do fator “Concentração”; (ii) a participação individual do fator “Tempo”; (iii) a participação individual do fator “Experimento”; (iv) a interação dos fatores “Concentração e Tempo” e “Concentração e Experimento”; e (v) a decomposição do fator “Tempo” somado a sua interação com o fator “Concentração” e do fator “Experimento” somado a sua interação com o fator “Concentração”, para indicar como esses atuaram em cada grupo do fator “Concentração” –, conforme descrito na **Tabela 6**:

(i) o fator “**Concentração**” foi estatística e toxicologicamente significativo para: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**, na modelagem tanto com o fator “Experimento” [ $F(5, 36) = 3,642, p < 0,01, \omega = 0,34$ ] quanto com o fator “Tempo” [ $F(5, 36) = 3,505, p < 0,05, \omega = 0,33$ ]; e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-**

**TdDmsa**, na modelagem tanto com o fator “Experimento” [ $F(5, 36) = 5,76, p < 0,01, \omega = 0,40$ ] quanto com o fator “Tempo” [ $F(5, 36) = 3,469, p < 0,05, \omega = 0,34$ ]; em ambos os nanomateriais, o fator está correlacionado com o aumento da fragmentação do ácido desoxirribonucleico;

(ii) o fator “**Experimento**” foi estatisticamente significativo para ambos os nanomateriais cobertos com **ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico**, indicando variação significativa entre as repetições experimentais: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $F(1, 36) = 43,554, p < 0,001, \omega = 0,54$ ] e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa** [ $F(1, 36) = 25,357, p < 0,001, \omega = 0,41$ ]; ainda, quando o fator “**Experimento**”, acrescido de sua interação com o fator “**Concentração**”, foi decomposto, verificou-se que, para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**, a variação entre as repetições influenciou significativamente vários grupos, mas ela não foi toxicologicamente relevante para nenhum deles – 0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 4,76, p < 0,05, \omega = 0,32$ ], 25,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 5, p < 0,05, \omega = 0,33$ ], 51,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 7,29, p < 0,05, \omega = 0,39$ ] e 204,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 19,99, p < 0,05, \omega = 0,57$ ]; já para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**, ocorreu nas concentrações de 204,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 6,23, p < 0,05, \omega = 0,36$ ] e de 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 9,46, p < 0,01, \omega = 0,43$ ], e foi toxicologicamente relevante para a primeira; por outro lado, e mesmo na ausência de interação significativa para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**, a variação interexperimental influenciou o resultado toxicológico na concentração de 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 41) = 5,24, p < 0,05, \omega = 0,34$ ];

(iii) o fator “**Tempo**” foi estatística e toxicologicamente relevante para ambos os nanomateriais cobertos com **citrate** – **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit** [ $F(1, 36) = 5,211, p < 0,05, \omega = 0,21$ ] e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $F(1, 36) = 11,278, p < 0,01, \omega = 0,32$ ]; ademais, quando decomposta a interação dos fatores “**Concentração e Tempo**”, acrescida do próprio fator “**Tempo**”, apontou-se que o fator influenciou significativamente a fragmentação do ácido desoxirribonucleico para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** [ $F(1, 41) = 6,95, p < 0,05, \omega = 0,38$ ], na concentração de **256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$** , mesmo na ausência de interação significativa, uma vez que o dano foi marcadamente reduzido após 24 horas.

**Tabela 6.** Análise bifatorial para os fatores “Concentração e Experimento” e “Concentração e Tempo” (ANOVA 2-Way) no ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

Fonte de Variação	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> CpCit		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> CpDmsa		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cp		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> TdCit		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> TdDmsa		Cit		Dmsa	
	p	ω	p	ω	p	ω	p	ω	p	ω	p	ω	p	ω
<b>Modelo</b>														
Concentração	0,576	0,11	0,065	0,21	<b>0,009</b>	<b>0,34</b>	0,777	0,16	<b>0,001</b>	<b>0,40</b>	0,763	0,17	0,701	0,16
Experimento	0,660	0,09	<b>0,000</b>	<b>0,54</b>	0,182	0,09	0,903	0,10	<b>0,000</b>	<b>0,41</b>	0,346	0,04	0,577	0,10
Concentração ∩ Experimento	0,740	0,16	0,313	0,09	0,104	0,21	0,436	0,02	0,232	0,12	0,600	0,13	0,402	0,03
Concentração + Experimento	0,803	-	<b>0,000</b>	-	0,207	-	0,515	-	<b>0,008</b>	-	0,561	-	0,480	-
Experimento ∩ C <sup>0</sup>	0,237	0,18	<b>0,035</b>	0,32	0,650	0,07	0,192	0,20	0,137	0,23	0,762	0,06	0,882	0,03
Experimento ∩ 12,8 µg.mL-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,632	0,09	0,084	0,33
Experimento ∩ 25,6 µg.mL-	0,626	0,08	<b>0,031</b>	0,33	0,450	0,12	0,483	0,11	0,383	0,14	-	-	-	-
Experimento ∩ 51,2 µg.mL-	0,973	0,00	<b>0,010</b>	0,39	0,259	0,18	0,248	0,18	0,522	0,10	0,144	0,28	0,788	0,05
Experimento ∩ 102,4 µg.mL-	0,316	0,16	0,102	0,25	0,312	0,16	0,350	0,15	0,239	0,18	0,510	0,13	0,614	0,10
Experimento ∩ 153 µg.mL-	-	-	0,087	0,26	-	-	0,620	0,08	-	-	-	-	-	-
Experimento ∩ 204,8 µg.mL-	0,905	0,02	<b>0,000</b>	0,57	0,470	0,11	0,471	0,11	<b>0,017</b>	0,36	-	-	-	-
Experimento ∩ 256 µg.mL-	0,596	0,64	-	-	<b>0,027</b>	0,34	-	-	<b>0,004</b>	0,43	-	-	-	-
<b>Modelo</b>														
Concentração	0,509	0,08	0,419	0,04	<b>0,011</b>	<b>0,33</b>	0,696	0,14	<b>0,012</b>	<b>0,34</b>	0,775	0,18	0,707	0,16
Tempo	<b>0,028</b>	<b>0,21</b>	0,650	0,09	0,355	0,03	<b>0,002</b>	<b>0,32</b>	0,343	0,03	0,794	0,12	0,596	0,11
Concentração ∩ Tempo	0,739	0,15	0,858	0,18	0,133	0,19	0,747	0,15	0,507	0,08	0,674	0,15	0,482	0,09
Concentração + Tempo	0,259	-	0,905	-	0,289	-	0,410	-	0,667	-	0,781	-	0,566	-
Tempo ∩ C <sup>0</sup>	0,063	0,29	0,516	0,10	0,743	0,05	0,340	0,32	0,589	0,09	0,855	0,03	0,928	0,02
Tempo ∩ 12,8 µg.mL-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,417	0,16	0,110	0,30
Tempo ∩ 25,6 µg.mL-	0,358	0,14	0,974	0,00	0,466	0,11	0,584	0,09	0,522	0,10	-	-	-	-
Tempo ∩ 51,2 µg.mL-	0,774	0,04	0,434	0,12	0,805	0,04	0,062	0,29	0,790	0,04	0,370	0,17	0,954	0,00
Tempo ∩ 102,4 µg.mL-	0,093	0,26	0,671	0,07	0,978	0,00	0,136	0,23	0,563	0,09	0,657	0,09	0,613	0,10
Tempo ∩ 153 µg.mL-	-	-	0,357	0,14	-	-	0,690	0,06	-	-	-	-	-	-
Tempo ∩ 204,8 µg.mL-	0,949	0,00	0,944	0,02	1,000	0,00	0,071	0,28	0,106	0,25	-	-	-	-
Tempo ∩ 256 µg.mL-	0,473	0,11	-	-	<b>0,012</b>	0,38	-	-	0,646	0,07	-	-	-	-

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**) ou com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**); e (ii) decomposição térmica, com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). **Cit**: citrato. **Dmsa**: ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **p**: significância. **ω**: tamanho do efeito. ∩: interação ou decomposição de fatores. (+): fator acrescido de sua interação com outro fator. □: fonte de variação sem relevância toxicológica. ■: fonte de variação com relevância toxicológica.

### 5.4.3. Análise multifatorial (ANOVA 4-Way)

A análise multifatorial para os fatores “Concentração”, “Tempo”, “Cobertura” e “Síntese” demonstrou, no modelo – (i) a participação individual de cada um desses fatores; e (ii) a interação entre esses fatores; e (iii) a decomposição de cada fator e de sua interação com outro (interações bifatoriais), para indicar como esses atuaram dentro do respectivo fator com o qual houve a interação. Entretanto, o balanceamento dos agrupamentos exigiu a exclusão das concentrações não comuns a todos os regimes de tratamento (153 e 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e de qualquer nanomaterial sem contraparte ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{Cp}$ ) –, conforme descrito na

#### **Tabela 7:**

(i) o fator “**Tempo**” foi estatística e toxicologicamente significativo [ $F(1, 120) = 4,997, p < 0,05$ ], enquanto que todos os demais não foram – “**Concentração**” [ $F(4, 120) = 1,329, p > 0,05$ ], “**Cobertura**” [ $F(1, 120) = 0,069, p > 0,05$ ] e “**Síntese**” [ $F(1, 120) = 0,121, p > 0,05$ ];

(ii) a interação dos fatores “**Concentração e Cobertura**” foi estatisticamente significativa [ $F(4, 120) = 3,353, p < 0,05$ ];

(iii) quando o fator “**Cobertura**”, acrescido de sua interação com o fator “**Concentração**”, foi decomposto para cada grupo experimental, houve significância estatística e toxicologicamente irrelevante na concentração de 0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [ $F(1, 154) = 7,77, p < 0,01$ ], mas relevante na de **204,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$**  [ $F(1, 154) = 5,25, p < 0,05$ ];

(iv) quando o fator “**Concentração**”, acrescido de sua interação com o fator “**Cobertura**”, foi decomposto para cada agrupamento experimental radicado pela cobertura, verificou-se que esses foram estatística e toxicologicamente relevante para a cobertura **Dmsa** [ $F(4, 151) = 3,38, p < 0,05$ ];

(v) a interação dos fatores “**Cobertura e Tempo**” foi estatística e toxicologicamente significativa [ $F(1, 120) = 12,763, p < 0,01$ ]; e a decomposição do fator “**Tempo**”, acrescido de sua interação com o fator “**Cobertura**”, indicou significância toxicologicamente relevante para a cobertura **Citrato** [ $F(1, 157) = 17,24, p < 0,001$ ]; e

(vi) nenhum dos seguintes polinomiais foi significativo - “**Concentração e Síntese e Cobertura**” [ $F(4, 157) = 0,569, p > 0,05$ ]; “**Concentração e Síntese e Tempo**” [ $F(4, 157) = 0,135, p > 0,05$ ]; “**Concentração e Cobertura e Tempo**” [ $F(4, 157) = 0,505, p > 0,05$ ]; “**Síntese e Cobertura e Tempo**” [ $F(1, 157) = 1,209, p > 0,05$ ]; e “**Concentração e Síntese e Cobertura e Tempo**” [ $F(4, 157) = 1,048, p > 0,05$ ].

**Tabela 7.** Análise multifatorial para os fatores “Tempo”, “Concentração”, “Cobertura” e “Síntese” (ANOVA 4-Way) no ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

Fonte de Variação	Fatoração	0 µg.mL <sup>-1</sup>	25,6 µg.mL <sup>-1</sup>	51,2 µg.mL <sup>-1</sup>	102,4 µg.mL <sup>-1</sup>	204,8 µg.mL <sup>-1</sup>
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Concentração	0,263	-	-	-	-	-
Tempo	<b>0,027</b>	-	-	-	-	-
Cobertura	0,793	-	-	-	-	-
Síntese	0,729	-	-	-	-	-
Concentração ∩ Síntese	0,761	-	-	-	-	-
Concentração ∩ Cobertura	<b>0,012</b>	-	-	-	-	-
Concentração + Cobertura	<b>0,026</b>	0,006	0,807	0,811	0,938	<b>0,023</b>
	Fatoração	Cp	Td	Cit	Dmsa	-
Fonte de Variação	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	-
Cobertura + Concentração	0,230	-	-	0,292	<b>0,011</b>	-
Síntese ∩ Cobertura	0,543	-	-	-	-	-
Síntese ∩ Tempo	0,936	-	-	-	-	-
Cobertura ∩ Tempo	<b>0,001</b>	-	-	-	-	-
Cobertura + Tempo	<b>0,000</b>	-	-	<b>0,000</b>	0,341	-

*p*: significância. ∩: interação de fatores. (+): decomposição de um fator acrescido de sua interação com outro fator. **Cp**: síntese por coprecipitação. **Td**: síntese por decomposição térmica. **Cit**: cobertura de citrato. **Dmsa**: cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico.

□: fonte de variação sem relevância toxicológica. ■: fonte de variação com relevância toxicológica.

### 5.5. Análise da replicação técnica

A **Tabela 8** representa a análise da variação entre as replicatas técnicas (lâmina ou gel) tomadas da mesma replicata biológica (subcultivo ou poço), para cada nanomaterial, cobertura e ponto temporal. Através desse procedimento foi possível realizar o controle de qualidade da replicação (correlação) e da variação por ela causada nesse nível experimental (variação intracaso).

Como se nota, apenas para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** a técnica de replicação foi fonte de variação significativa [ $F(1, 23) = 5,208, p < 0,05$ ] e a correlação entre as lâminas foi baixa ( $r = 0,227, p > 0,05$ ), mas esse não foi um achado de relevância toxicológica.

**Tabela 8.** Análise da replicação técnica das lâminas (correlação) e da variação causada pela amostragem dos poços (variação intracaso) em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

Substância Teste	Tempo	Variação IntraCasos		Correlação	
		F	p	R	p
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit</b>	6h	0,687	0,416	0,575	0,002
	24h	0,949	0,340	0,572	0,002
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa</b>	6h	0,095	0,761	0,446	0,014
	24h	0,427	0,520	0,744	0,001
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp</b>	6h	1,020	0,323	0,860	0,001
	24h	0,109	0,745	0,632	0,001
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit</b>	6h	5,208	<b>0,032</b>	0,227	<b>0,143</b>
	24h	1,973	0,173	0,451	0,013
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa</b>	6h	0,005	0,944	0,566	0,002
	24h	0,000	0,985	0,636	0,001
<b>Cit</b>	6h	0,516	0,484	0,718	0,001
	24h	0,735	0,405	0,615	0,006
<b>Dmsa</b>	6h	0,540	0,474	0,954	0,001
	24h	0,878	0,364	0,616	0,006

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**) ou com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**); e (ii) decomposição térmica, com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). **Cit**: citrato. **Dmsa**: ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **p**: significância. **F**: estatística da análise de variância (ANOVA). **R**: coeficiente de correlação de Pearson.

### 5.5. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

A **Figura 39** representa células binucleadas típicas e a **Figura 40** demonstra células tratadas, coradas com eosina e contrastadas com azul da Prússia (identificação de ferro contido nas nanopartículas aglomeradas).

Na **Tabela 9** e no **Apêndice 9.3 (Quadro 15)**, que representam os dados de cada nanomaterial e cobertura referentes à genotoxicidade (frequência de micronucleação) e a citotoxicidade (índice de proliferação), observa-se que:

(i) houve associação estatisticamente significativa para a frequência de micronúcleos quando comparados os grupos controle positivo (mitomicina-C) e negativo em todos os conjuntos – **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**, **Citrato** e **Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico** [ $\chi^2(1) = 145,44$ ,  $p < 0,001$ ;  $\Phi = 0,191$ ,  $p < 0,001$ ;  $O_R = 7,147$ ]; **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $\chi^2(1) = 126,089$ ,  $p < 0,001$ ;  $\Phi = 0,178$ ,  $p < 0,001$ ;  $O_R = 6,586$ ]; e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa** [ $\chi^2(1) = 108,225$ ,  $p < 0,001$ ;  $\Phi = 0,164$ ,  $p < 0,001$ ;  $O_R = 5,723$ ];

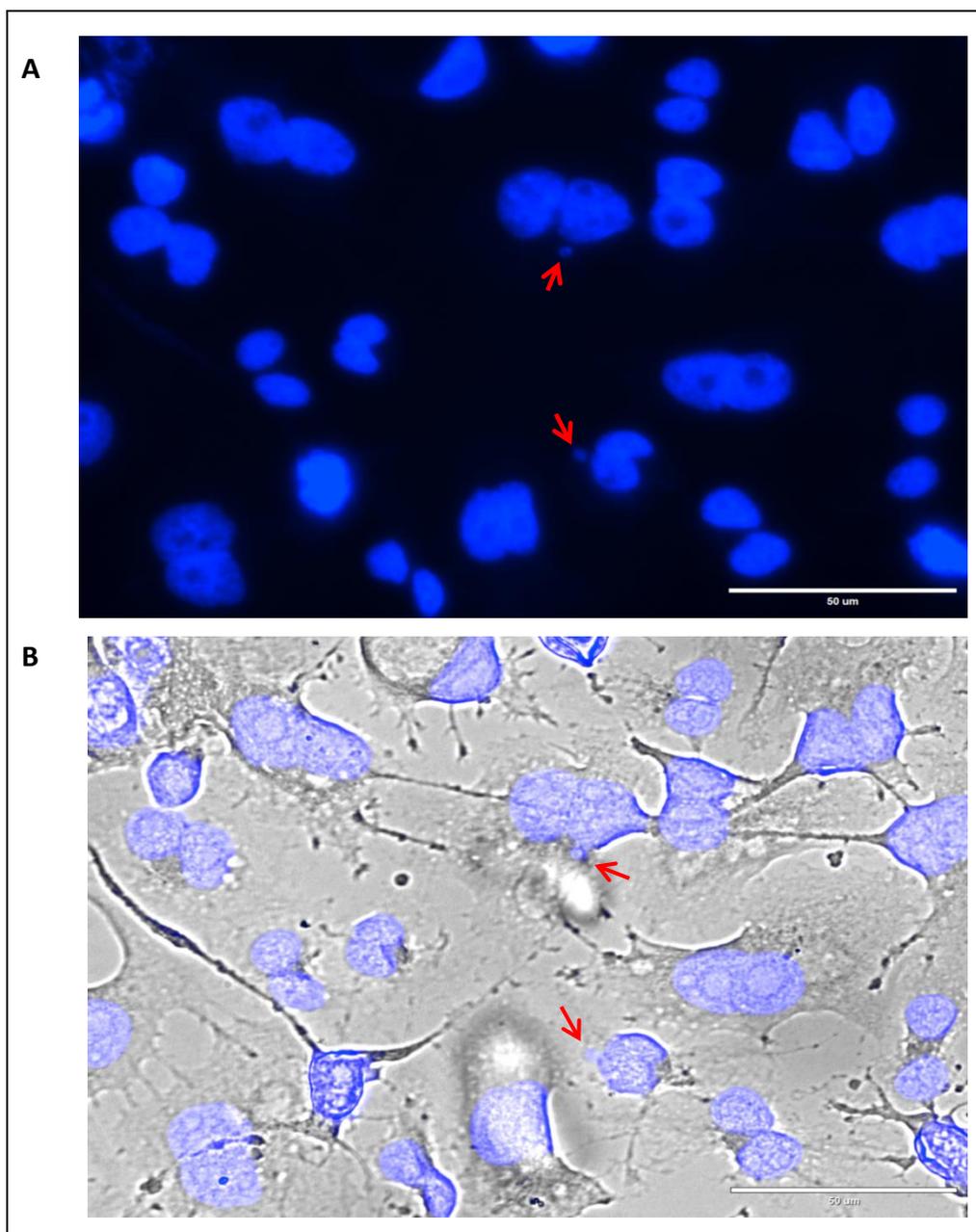
(ii) não houve associação estatisticamente significativa entre a frequência de micronúcleos e o tratamento com qualquer nanomaterial ou cobertura, em nenhuma das concentrações: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** [ $\chi^2(7) = 0,852$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,007$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [0,97;1,12]$ ]; **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit** [ $\chi^2(7) = 1,173$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,009$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [1,00;1,22]$ ]; **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $\chi^2(7) = 0,480$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,005$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [0,88;1,00]$ ]; **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $\chi^2(7) = 1,134$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,008$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [0,94;1,19]$ ]; **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa** [ $\chi^2(7) = 1,121$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,008$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [0,85;1,06]$ ]; **Citrato** [ $\chi^2(3) = 0,174$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,005$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [1,00;1,09]$ ]; e **Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico** [ $\chi^2(3) = 0,638$ ,  $p > 0,05$ ;  $\Phi = 0,009$ ,  $p > 0,05$ ;  $O_R = [0,91;1,09]$ ];

(iii) houve redução da proliferação celular quando comparados os grupos controle positivo (mitomicina-C) e negativo em todos os conjuntos – **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**, **Citrato** e **Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico** [ $C^+ (1 \pm 0)$ ;  $C^- (2 \pm 0)$ ;  $t(2) = -37,119$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 1$ ]; **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** [ $C^+ (1 \pm 0)$ ;  $C^- (2 \pm 0)$ ;  $t(2) = -42,485$ ,  $p < 0,001$ ,  $r = 1$ ]; e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa** [ $C^+ (1 \pm 0)$ ;  $C^- (2 \pm 0)$ ;  $t(2) = -19,393$ ,  $p < 0,01$ ,  $\omega = 1$ ];

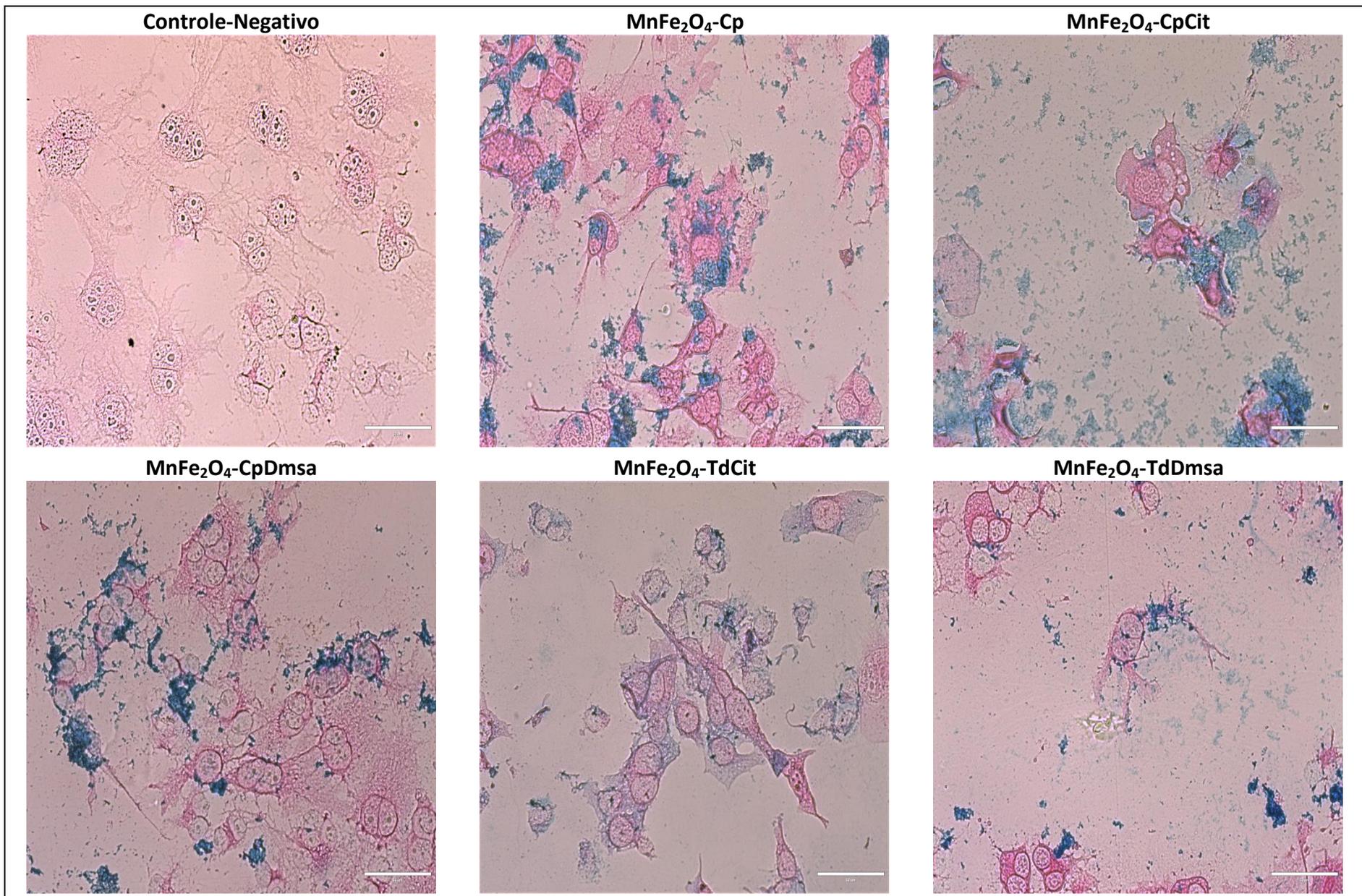
(iv) não houve efeito estatisticamente significativo sobre a proliferação celular por causa do tratamento com os seguintes nanomateriais e coberturas: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp** [ $F(7, 8) = 0,341$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,64$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit** [ $F(7, 8) = 1,432$ ,  $p > 0,05$ ,  $\omega = 0,49$ ], **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-**

**TdDmsa** [ $F(7, 8) = 1,768, p > 0,05, \omega = 0,49$ ], **Citrato** [ $F(3, 4) = 0,228, p > 0,05, \omega = 0,66$ ] e **Ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico** [ $F(3, 4) = 0,66, p > 0,05, \omega = 0,37$ ]; e

(v) houve redução toxicologicamente relevante da proliferação celular decorrente do tratamento com: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** [ $F(7, 8) = 6,951, p < 0,01, \omega = 0,85$ ], nas concentrações de 179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Dunnett,  $p < 0,05$ ) e 204,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Dunnett,  $p < 0,01$ ); e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**, nas de 179,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 204,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Dunnett,  $p < 0,05$ ), mesmo embora não tenha sido observada diferença significativa no teste ANOVA [ $F(7, 8) = 2,739, p > 0,05, \omega = 0,62$ ].



**Figura 39.** Micrografias de células binucleadas de monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) micronucleadas no teste com bloqueio da citocinese. **(A)** Fluorescência (filtro DAPI). **(B)** Sobreposição (fluorescência e campo claro). **Setas:** micronúcleos (grupo controle negativo; 60x; Barra = 50  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 40.** Micrografias de monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados no teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese com nanopartículas de ferrita de manganês, pelo tempo de 48 horas e concentração de 51,2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os aglomerados de nanopartículas são identificados pelo método do azul da Prússia. As nanopartículas de ferrita foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Cp}$ ) ou com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpDmsa}$ ); (ii) decomposição térmica, com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ). Filtro: campo claro (60x). Barra (50  $\mu\text{m}$ ).

**Tabela 9.** Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

		C+	C- (0 µg.mL <sup>-1</sup> )	12,8 µg.mL <sup>-1</sup>	25,6 µg.mL <sup>-1</sup>	51,2 µg.mL <sup>-1</sup>	76,8 µg.mL <sup>-1</sup>	102,4 µg.mL <sup>-1</sup>	153,6 µg.mL <sup>-1</sup>	179,2 µg.mL <sup>-1</sup>	204,8 µg.mL <sup>-1</sup>	256 µg.mL <sup>-1</sup>
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t***</sup>	2 ± 0	-	2 ± 0	2 ± 0	-	1,9 ± 0	2 ± 0	1,9 ± 0	2 ± 0	1,9 ± 0
<b>Cp</b>	MN	110 ± 11 <sup>Q***</sup>	17 ± 2	-	18 ± 2	17 ± 1	-	19 ± 2	16 ± 0	19 ± 1	18 ± 2	16 ± 2
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t***</sup>	2 ± 0	-	2 ± 0	2 ± 0	-	1,9 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1,9 ± 0
<b>CpCit</b>	MN	99 ± 2 <sup>Q***</sup>	16 ± 2	-	19 ± 2	18 ± 2	-	20 ± 2	19 ± 0	16 ± 0	18 ± 1	18 ± 0
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t***</sup>	2 ± 0	-	2,02 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0 <sup>D*</sup>	1,9 ± 0 <sup>D*</sup>	-
<b>TdCit</b>	MN	99 ± 2 <sup>Q***</sup>	16 ± 2	-	18 ± 2	18 ± 1	17 ± 1	19 ± 0	17 ± 2	17 ± 0	15 ± 0	-
<b>Cit</b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t***</sup>	2 ± 0	2 ± 0	-	2 ± 0	-	2 ± 0	-	-	-	-
	MN	110 ± 11 <sup>Q***</sup>	17 ± 2	18 ± 2	-	17 ± 2	-	17 ± 2	-	-	-	-
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t**</sup>	2 ± 0	-	2 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,8 ± 0 <sup>D*</sup>	1,7 ± 0 <sup>D**</sup>	-
<b>CpDmsa</b>	MN	92 ± 3 <sup>Q***</sup>	17 ± 0	-	16 ± 2	15 ± 0	17 ± 2	17 ± 0	17 ± 2	17 ± 4	16 ± 2	-
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t**</sup>	2 ± 0	-	2 ± 0	2 ± 0	-	2 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0	1,9 ± 0
<b>TdDmsa</b>	MN	92 ± 3 <sup>Q***</sup>	17 ± 0	-	16 ± 0	17 ± 2	-	16 ± 0	18 ± 0	15 ± 1	18 ± 2	17 ± 0
<b>Dmsa</b>	IPBC	1,1 ± 0 <sup>t***</sup>	2 ± 0	2 ± 0	-	1 ± 0	-	1,9 ± 0	-	-	-	-
	MN	110 ± 11 <sup>Q***</sup>	17 ± 2	15 ± 0	-	18 ± 2	-	16 ± 2	-	-	-	-

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**) ou com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**); e (ii) decomposição térmica, com coberta de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). **Cit**: citrato. **Dmsa**: ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **IPBC**: índice de proliferação com bloqueio da citocinese. **MN**: frequência de micronucleação. **C+**: controle positivo (Mitomicina-C). **C-**: controle negativo (LHC 9 + solução de albumina). **t**: Teste t de Student. **Q**: Teste do Qui-Quadrado de Pearson. **D**: Teste de Dunnett. Dados representados como média ± desvio padrão (IPBC, n = 100; MN, n = 1000). A significância foi definida como: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

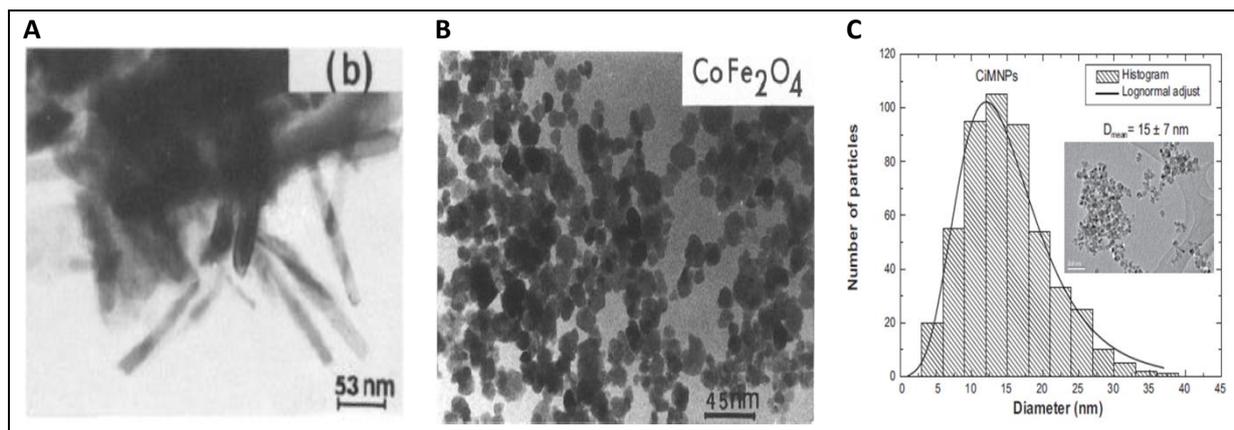
## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização dos nanomateriais

#### 6.1.1. Nanopartículas sintetizadas por coprecipitação

A caracterização dos nanomateriais sintetizados por coprecipitação demonstrou que a forma de bastão observada na **Figura 21(A)** não está em concordância com a literatura majoritária. Segundo o material e métodos e a **Figura 41(C)** relatada em [NUNES \*et al\* \(2014\)](#), a forma esperada seria a esférica. Esse achado se confirma ao se rastrear a literatura precedente referente ao desenvolvimento dessa via sintética de ferrofluidos aquosos desenvolvida por [MASSART \(1981\)](#) e aprimorada por diversos autores: [MASSART & CABUIL \(1987\)](#), [TOURINHO \*et al\* \(1989\)](#), [MASSART \*et al\* \(1995\)](#), [SOUSA \*et al\* \(2001\)](#), [BABAEI \*et al\* \(2018\)](#). E isso porque a ferrita de manganês é uma isoestrutura, sem anisotropia cristalina ou de forma ([ANGOTZI \*et al\*, 2017](#)), e de alta simetria cristalina ([MONTFERRAND \*et al\*, 2012](#)).

Segundo [TOURINHO \*et al\* \(1990\)](#), o diâmetro das partículas (leia-se, também, “a forma”), a polidispersão, o rendimento e a reprodutibilidade desses parâmetros é determinada pelos fatores críticos identificados para a via de coprecipitação, quais sejam: (i) a acidez inicial da mistura das soluções reagentes de  $\text{MnCl}_2\text{-FeCl}_3$  – isto é, a prevenção da hidrólise e indisponibilização de  $\text{FeCl}_3$  antes da adição da base (HCl a 3% p/p, ou outro ácido); (ii) composição inicial da mistura – isto é, a razão molar dos cátions ( $X_0$ )  $\rightarrow X_0 = 0,33 - > [X_0 = \text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{2+} + \text{Fe}^{3+}]$  ou sua proporção em massa (2  $\text{MnCl}_2$  : 1  $\text{FeCl}_3$ ); (iii) a composição e a alcalinidade da base adicionada à mistura (metilamina -  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ , hidróxido de sódio – NaOH, amônia –  $\text{NH}_3$ , entre outros); (iv) a técnica de mistura – isto é, a adição da totalidade da base à mistura o mais rápido o possível (10 segundos, aproximadamente), e misturando-a de forma vigorosa e rápida. Ainda, os mesmos autores comprovaram que a aplicação de campo magnético durante a síntese poderia direcionar o plano de crescimento da fase cristalina, dando origem a ferrita na forma de bastão ([TOURINHO \*et al\*, 1989](#)). Ademais, [SOUSA \*et al\* \(2001\)](#) adicionam que a síntese de espinélios magnéticos na temperatura a 100°C também seria crítica. Igualmente, [VASYLKIV \*et al\* \(2016\)](#) descrevem que a ocorrência de óxido de ferro com a forma de bastão implicaria um crescimento anisotrópico, a partir de fase precursora e preferencialmente no plano perpendicular ao plano (010), por transformação topotática. Portanto, o viés em qualquer desses pontos críticos de controle poderá ser reputado como causalidade do artefato morfológico aqui relatado.



**Figura 41.** Morfologia esperada de nanopartículas de ferrita ( $MFe_2O_4$ ) sintetizadas por coprecipitação. **(A)** Morfologia de bastão de  $CoFe_2O_4$  e  $MnFe_2O_4$  submetidas a campo magnético durante a síntese por coprecipitação. **(B)** Morfologia esférica de  $CoFe_2O_4$  e  $MnFe_2O_4$  sintetizadas por coprecipitação. **(C)** Morfologia esférica de  $MnFe_2O_4$  sintetizada por coprecipitação. **Fontes:** [TOURINHO et al \(1989\)](#), [TOURINHO et al \(1990\)](#) e [NUNES et al \(2014\)](#).

Por outro lado, as demais características guardaram coerência com aquelas encontradas nas referências já citadas.

#### 6.1.1.1. $MnFe_2O_4Cp$

As nanopartículas sem cobertura ( $MnFe_2O_4Cp$ ) foram peptizadas após sua precipitação e lavagem, e a adição de ácido nítrico ( $HNO_3$ ) tornou a solução ácida e estável, por que os contra-íons são pouco ou nem um pouco polarizantes e não floculantes ( $NO_3^-$ ); a acidificação também tornou a superfície das partículas positivamente carregadas, por causa da adsorção de íons ( $H^+$  ou  $H_3O^+$ ); a densidade da carga superficial poderia ter atingido até  $0,2 C/m^2$ ; como a rotação Browniana é o processo cinético dominante em nanofluidos, a carga superficial eletrostaticamente repulsiva nessa densidade teria superado as atrações magnéticas e de Van der Waals entre as partículas e teria garantido a estabilidade coloidal; como não houve funcionalização, a superfície particulada permaneceu diprótica (anfotérica), isto é, a estabilidade eletrostática do coloide permaneceu sensível a reações do tipo ácido-base, cuja carga superficial dependeu diretamente do pH e do equilíbrio químico na interface das fases ([TOURINHO et al, 1989](#); [TOURINHO et al, 1990](#); [SOUSA et al, 2001](#)).

Ainda, segundo [BRONZE-UHLE et al \(2017\)](#), [YU et al \(2016\)](#), [BARBOSA et al \(2010\)](#), [YANG et al \(2009\)](#) e [BÖHME & SCHELER \(2007\)](#), a albumina sérica bovina: é altamente hidrossolúvel; tem carga que varia com o pH, em função da conformação e quantidade de grupos expostos de seus aminoácidos ( $\xi \approx -12,5$  mV, se  $pH \approx 7$ , e continua eletronegativa, se  $pH \geq 5,4$ ); apresenta redução da repulsão das interações proteína-proteína e a formação de dímeros somente perto de seu ponto isolétrico ( $pH 5,4$ ) e a altas concentrações ( $\approx 50$

mg/mL); interage eletrostaticamente e liga-se não-covalentemente a uma gama de moléculas (in)orgânicas; possui estrutura tridimensional globular (66 kDa) homóloga a da albumina sérica humana; mantém sua conformação em pH entre 4 e 9; tem pequeno diâmetro hidrodinâmico ( $D_H = 8-9$  nm, se  $\text{pH} \approx 7$ ). Portanto, são coerentes os valores positivos do potencial zeta mensurados no Zetasizer, tanto em água molecular ( $\xi\text{-H}_2\text{O} = 47 \pm 1$  mV;  $\text{pH} = 5,7$ ), o qual indica a estabilidade coloidal da dispersão estoque (como sintetizada e custodiada), quanto em solução de albumina, a qual reduziu a carga ( $\xi\text{-BSA} = 32 \pm 0$  mV;  $\text{pH} \approx 7$ ;  $\Delta\zeta = 15$  mV), mas ainda o manteve dentro da faixa de estabilidade coloidal. Também é coerente o diâmetro hidrodinâmico na presença de albumina em relação a sua ausência ( $D_{H\text{BSA}} = 100 \pm 1$ ;  $\text{pH} \approx 7$ ;  $\Delta_{DH} = 19,57$  nm), e em ambos os dispersantes os coloides demonstraram-se monodispersos. Também, 50% das nanopartículas dispersas em água ultrapura e rastreadas individualmente tiveram diâmetro inferior a 90,9 nm, medida próxima do diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_{H\text{H}_2\text{O}} = 80 \pm 0$  nm). E a adsorção da albumina foi comprovada pela redução da carga superficial e pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico. Apesar disso, a posterior redispersão em meio de cultivo celular desequilibrou o coloide, cuja prova de fato foi demonstrada pela difusa aglomeração de partículas (**Figura 40**), para um diâmetro aquém do limite de confiabilidade do Zetasizer ( $D_{H\text{LHC9}} = 2.434,6$  nm;  $\text{PDI-LHC9} = 0,687$ ).

#### 6.1.1.2. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpCit*

Por outro lado, as nanopartículas com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpCit**) não teriam apresentado padrões de interação com a albumina, tanto em água molecular ( $\xi\text{-H}_2\text{O} = -46 \pm 0$  mV;  $\text{pH} = 5,7$ ), a qual indica a estabilidade coloidal da dispersão estoque, quanto em solução de albumina; essa poderia ter competido com as nanopartículas na aferição da mobilidade eletroforética e assim ter implicado na redução do potencial zeta ( $\xi\text{-BSA} = -29 \pm 1$  mV;  $\text{pH} \approx 7$ ;  $\Delta\zeta = 16,7$  mV), mas o qual ainda permaneceu perto do limite inferior da faixa de estabilidade coloidal. Não houve alteração do diâmetro hidrodinâmico na presença de albumina em relação a sua ausência ( $D_{H\text{BSA}} = 47 \pm 1$ ;  $\text{pH} \approx 7$ ;  $\Delta_{DH} = 0$  nm), apesar de que em ambos os dispersantes os coloides demonstraram-se monodispersos. Também, apenas 10% das partículas dispersas em água ultrapura e rastreadas individualmente tiveram diâmetro inferior a 45,9 nm, medida próxima do diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_{H\text{H}_2\text{O}} = 47 \pm 0$  nm). E a posterior redispersão em meio de cultivo celular também causou o mesmo desequilíbrio

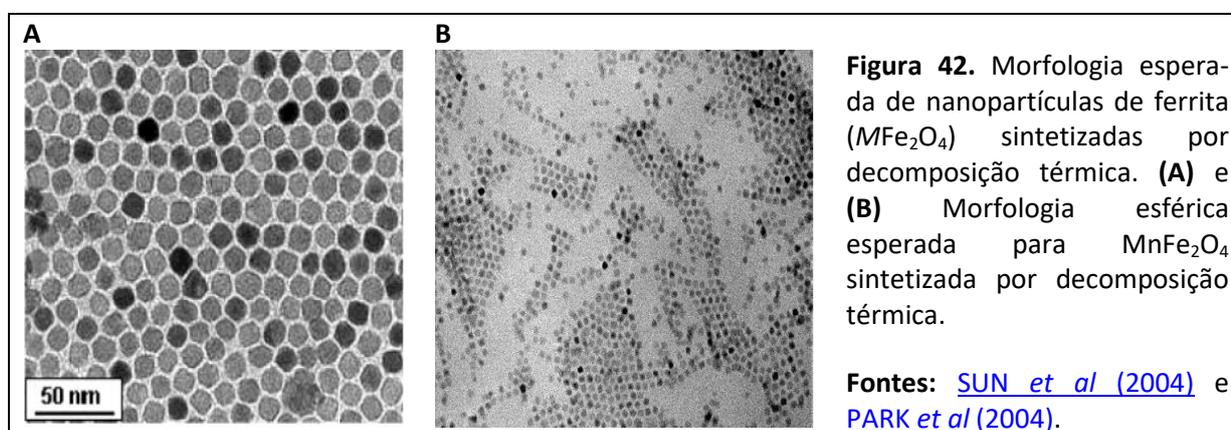
do nanomaterial (**Figura 40**), mesmo na monodispersão ( $D_{HLHC9} = 1.028,6$  nm;  $PDI-LHC9 = 0,248$ ).

### 6.1.1.3. $MnFe_2O_4CpDmsa$

Igualmente, as nanopartículas com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico ( $MnFe_2O_4CpDmsa$ ) também não teriam apresentado padrões de interação com a albumina, tanto em água molecular ( $\xi-H_2O = -50 \pm 1$  mV;  $pH = 5,7$ ), a qual indica a estabilidade coloidal da dispersão estoque, quanto em solução de albumina; essa poderia ter competido com as nanopartículas na aferição da mobilidade eletroforética e assim ter implicado na redução da carga ( $\xi-BSA = -30 \pm 1$  mV;  $pH \approx 7$ ;  $\Delta\zeta = 19,3$  mV), mas que ainda restou dentro da faixa de estabilidade coloidal. Não houve incremento proporcional do diâmetro hidrodinâmico na presença de albumina em relação a sua ausência ( $D_{HBSA} = 84 \pm 2$ ;  $pH \approx 7$ ;  $\Delta D_H = 5,2$  nm), e em ambos os dispersantes os coloides demonstraram-se monodispersos. E, de acordo com o verificado para as nanopartículas sem cobertura, 50% das partículas dispersas em água ultrapura e rastreadas individualmente tiveram diâmetro menor que 88,2 nm, medida próxima do diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_{HH_2O} = 79 \pm 6$  nm). Na posterior redispersão em meio de cultivo celular também ocorreu desequilíbrio desse nanomaterial (**Figura 40**), apesar da monodispersão ( $D_{HLHC9} = 2.525$  nm;  $PDI-LHC9 = 0,219$ ).

### 6.1.2. Nanopartículas sintetizadas por decomposição térmica

No que tange aos demais nanomateriais, a caracterização comprovou que a morfologia esférica vista na **Figura 22(A)** e na **Figura 23(A)**, e obtida por decomposição térmica, está coerente com aquela inicialmente descrita por [SUN et al \(2004\)](#) e reproduzida por [PARK et al \(2004\)](#) e [ZHANG et al \(2017\)](#), e registradas na **Figura 42**.



#### 6.1.2.1. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdCit*

Não se pôde comprovar se as nanopartículas com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdCit**) interagiram com a albumina; houve estabilidade coloidal da dispersão estoque analisada em água molecular ( $\xi\text{-H}_2\text{O} = -55 \pm 1$  mV; pH = 5,7); o potencial zeta analisado em solução de albumina diminuiu ( $\xi\text{-BSA} = -39 \pm 0$  mV; pH  $\approx$  7;  $\Delta\zeta = 15,6$  mV), mas ainda ficou contido dentro dos limites de estabilidade; mas não se pôde diferenciar se esse decréscimo decorreu da competição da albumina com as nanopartículas na aferição da mobilidade eletroforética, ou se houve interação com a cobertura, por causa da ampla faixa de diâmetro hidrodinâmico e da relativa polidispersão, na ausência de albumina ( $D_{\text{H}_2\text{O}} = 155 \pm 5$ ; pH  $\approx$  5,7) e em sua presença ( $D_{\text{HBSA}} = 337 \pm 28$ ; pH  $\approx$  7;  $\Delta_{\text{DH}} = 182,63$  nm). Apesar disso, a posterior redispersão em meio de cultivo celular causou o menor desequilíbrio dentre todos os demais nanomateriais (**Figura 40**), como se aduz da granulometria macroscópica aparentemente menor e mais homogênea dos aglomerados depositados sobre as células e a matriz extracelular ( $D_{\text{HLHC9}} = 204,8$  nm; PDI-LHC9 = 0,352). Ainda mais, apenas 10% das partículas dispersas em água ultrapura e rastreadas individualmente tiveram diâmetro menor que 158,2 nm, medida próxima do diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_{\text{H}_2\text{O}} = 155 \pm 5$  nm).

#### 6.1.2.2. *MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdDmsa*

Também não se pôde detectar se as nanopartículas com cobertura de ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdDmsa**) interagiram com a albumina; houve estabilidade coloidal da dispersão estoque analisada em água molecular ( $\xi\text{-H}_2\text{O} = -33 \pm 0$  mV; pH = 5,7); o potencial zeta analisado em solução de albumina diminuiu ( $\xi\text{-BSA} = -22 \pm 0$  mV; pH  $\approx$  7;  $\Delta\zeta = 11,2$  mV), fora do intervalo de estabilidade; mas não se pôde discorrer se esse decréscimo decorreu da competição da albumina com as nanopartículas na aferição da mobilidade eletroforética, ou se houve interação com a cobertura, por causa da ampla faixa de diâmetro hidrodinâmico e da relativa polidispersão na ausência de albumina ( $D_{\text{H}_2\text{O}} = 467 \pm 9$ ; pH  $\approx$  5,7) e em sua presença ( $D_{\text{HBSA}} = 354 \pm 11$ ; pH  $\approx$  7;  $\Delta_{\text{DH}} = 113$  nm). Apesar disso, a posterior redispersão em meio de cultivo celular também causou desequilíbrio (**Figura 40**), ( $D_{\text{HLHC9}} = 561,54$  nm; PDI-LHC9 = 0,467), mas em menor extensão do que o nanomaterial contraparte (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpDmsa**). Ainda mais, 50% das partículas dispersas em água ultrapura rastreadas individualmente tiveram diâmetro menor que 146,3 nm, medida muito distante do diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_{\text{H}_2\text{O}} = 467 \pm 9$  nm).

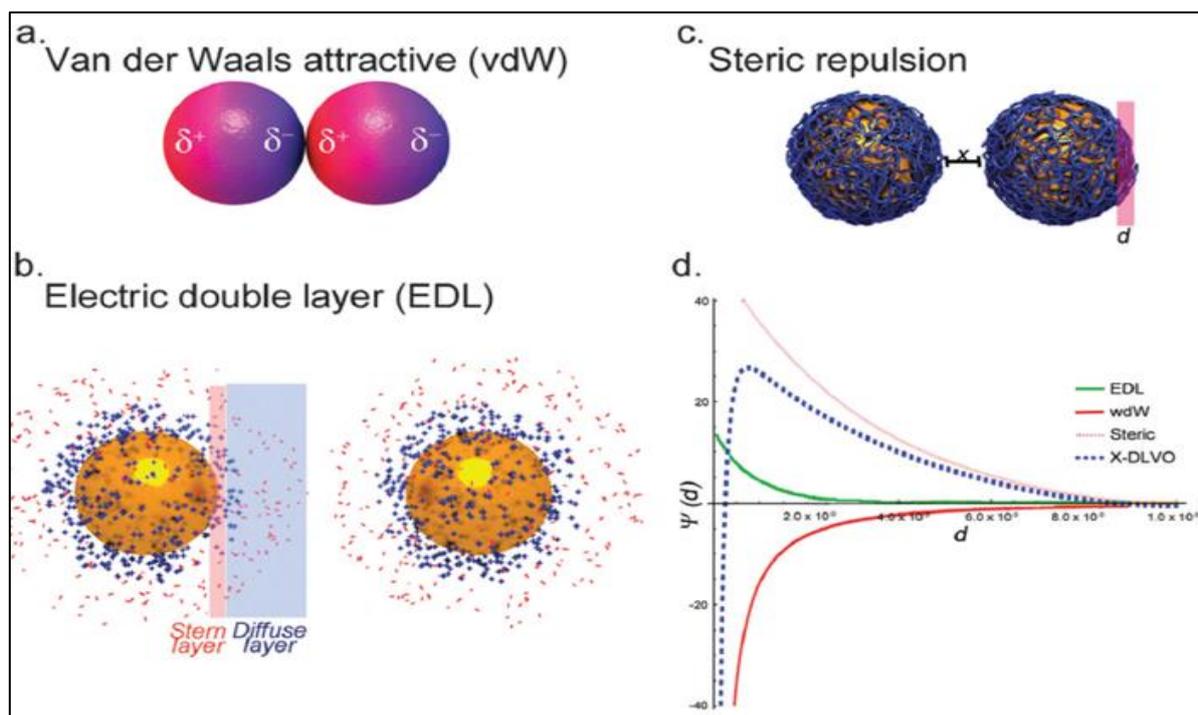
### 6.1.3. Comportamento no meio de cultivo

No que se remete a vantajosidade da dispersão prévia do coloide em **solução de albumina** e sua incorporação à estratégia de teste *in vitro*, rememora-se que essa é uma prática preconizada pelo protocolo de dispersão do [NANOGENOTOX \(2013\)](#). Conforme parte do grupo líder que desenvolveu esse protocolo ([HARTMANN \*et al\*, 2015](#)), a finalidade do procedimento foi fornecer parâmetros padronizados e propiciar a comparabilidade de resultados entre os estudos de genotoxicidade, baseando-se nos pressupostos de que: adjuvantes de natureza biológica são preferidos sobre os sintéticos; e a albumina foi capaz de facilitar a dispersão de nanotubos de carbono, tanto de parede única como de paredes múltiplas, e também reduziu o tamanho de aglomerados para diversos outros nanomateriais (TiO<sub>2</sub>, ZnO e SiO<sub>2</sub>); e para alguns meios de cultivo, a concentração de fosfato foi fator crítico na dispersabilidade. Ademais, [VIPPOLA \*et al\* \(2009\)](#) já tinham comparado a dispersabilidade de TiO<sub>2</sub> (rutila e anatase) e nanotubos de carbono (paredes únicas ou múltiplas) em adjuvantes, isoladamente ou em combinação (BSA – como fonte de proteína; DPPC – dipalmitoil fosfatidilcolina, como modelo de surfactante pulmonar); a conclusão foi a de que a adição de proteína, sozinha, foi mais efetiva na dispersão. E a aglomeração pode ser encarada como comportamento natural, esperado e parte de uma avaliação realista ([LOUREIRO \*et al\*, 2015](#)).

Agora, quanto ao comportamento dos nanomateriais na redispersão em meio de cultivo (LHC9), [PETRI-FINK \*et al\* \(2008\)](#) e [MOORE \*et al\* \(2015\)](#) reiteraram que, quando nanopartículas fossem introduzidas em meios biológicos complexos (contendo eletrólitos e macromoléculas orgânicas), uma série de forças anteriormente coexistindo passariam a interagir em desequilíbrio (**Figura 43**). Via de regra, ocorreria a formação de aglomerados de diversos diâmetros hidrodinâmicos e com densidades efetivas distintas, o que causaria polidispersão e afetaria outros parâmetros de significância biológica e sua reprodutibilidade experimental (sedimentação, dosimetria, internalização, toxicidade, cinética, dinâmica, etc).

A estabilização eletrostática (ferrita peptizada e sem cobertura, ou estabilizada com citrato), concorrentemente à ausência de fonte de proteínas séricas (que confeririam proteção eletrostática pela formação da coroa), seria sensível a desorção do estabilizante da superfície ou a compressão ou supressão da dupla camada eletrônica pelo aumento da força iônica (o efeito de *screen* dos íons multivalentes poderia ser mais eficiente que os monovalentes); [WANG \*et al\* \(2017<sup>2</sup>\)](#) reforçam que cátions divalentes proporcionariam maior

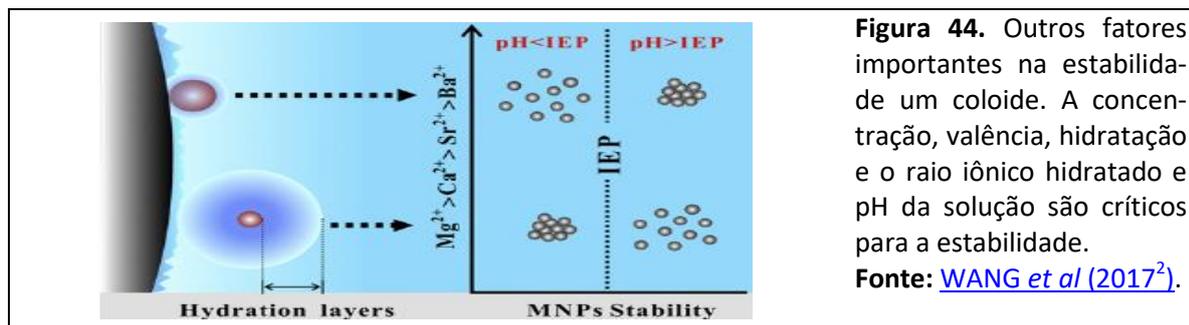
força iônica e mais contra-íons para percorrer (*screen*) a carga superficial, reduziriam drasticamente o comprimento da distância de Debye e comprimiriam a dupla camada eletrônica de forma mais efetiva, além de poderem fomentar a formação de pontes entre partículas (**Figura 44**). Segundo [SZEKERES et al \(2013\)](#), a tolerância de óxidos de ferro estabilizados com citrato a força iônica seria limitada ( $\approx 70$  mM) e que a presença de tampão fosfato (PBS) causaria rápida coagulação.



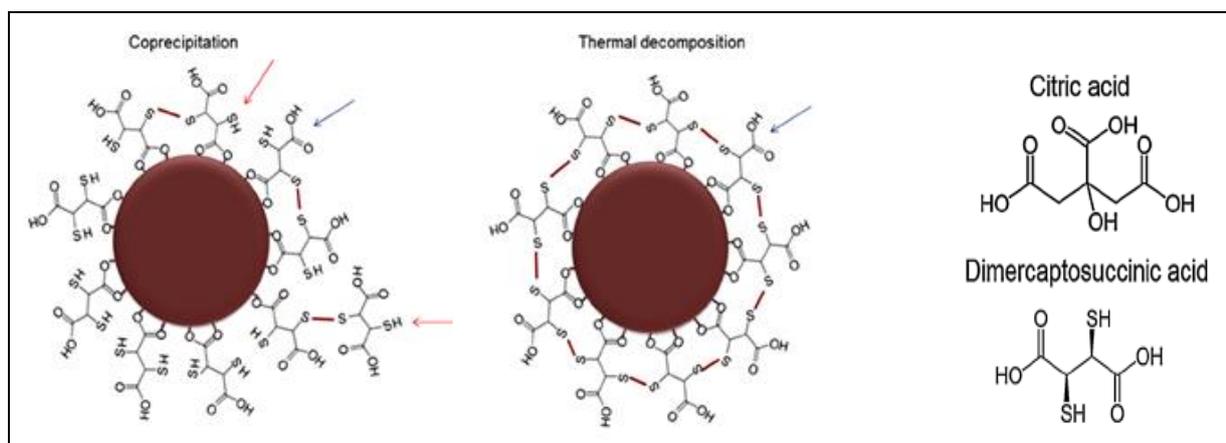
**Figura 43.** Forças interagindo entre as nanopartículas de um coloide. **(a)** *Van der Waals* \_ atração de curta distância; entre dipolos transientes ou permanentes decorrentes das ligações interatômicas. **(b)** *Dupla camada elétrica* \_ repulsão de curta distância; a carga superficial decorrente da ionização/dissociação de grupos ou da adsorção de moléculas ou íons carregados é contraposta pela nuvem próxima íons - camada de Stern - e pela nuvem mais distante de íons - camada difusa -, e quando duas partículas se aproximam, interações osmóticas repulsivas as repelem; mas, o aumento da força iônica do meio e a proximidade do ponto isoelétrico comprimem a dupla camada. **(c)** *Impedimento estérico* \_ repulsão de curta distância - recuo elástico -, ou de longa distância - pressão osmótica; moléculas de alto peso podem interagir entre si e causar a floculação por meio de pontes intermoleculares. **(d)** *Modelo estendido de Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (X-DLVO)* \_ além das citadas, outras forças repulsivas – hidratação -, ou atrativas - hidrofobicidade e dipolos magnéticos - se somam ao modelo). **Fonte:** [MOORE et al \(2015\)](#).

Ainda consoante [MOORE et al \(2015\)](#), a estabilização estérica seria uma estratégia melhor, menos dependente da força iônica, e se a macromolécula fosse adsorvida e não ligada covalentemente à superfície, ainda assim seria suscetível de desestabilização, pois poderia ser competitivamente desorvida da superfície; mas se fosse ligada covalentemente, a estabilidade seria maior, mas, mesmo assim, macromoléculas de alto

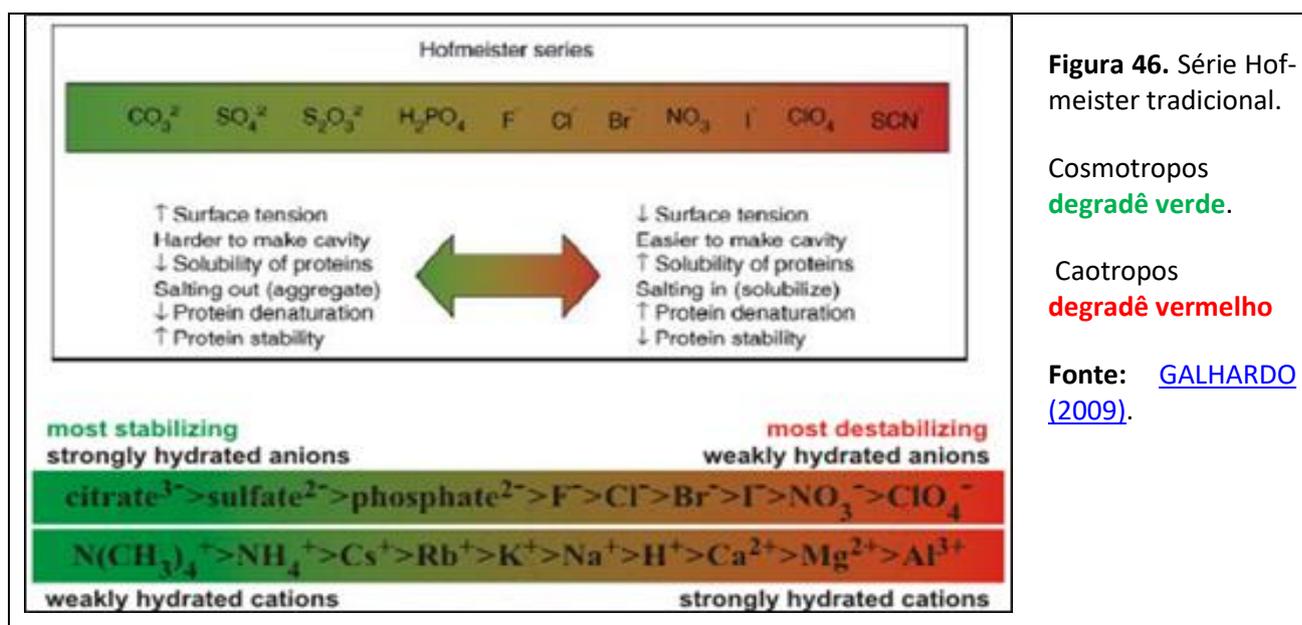
peso molecular poderiam interagir entre si e causar a floculação por meio de pontes intermoleculares.



A estabilização eletrostérica (BSA e ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico) seria mais efetiva, mas nem por isso insuscetível de *screen* ou de desorção competitiva. Tanto que [CHEN et al \(2008\)](#) demonstraram a formação de ligações cruzadas intermoleculares por meio de pontes dissulfeto, o que ajudaria a estabilizar o óxido de ferro. Mas [RUIZ et al \(2014\)](#) revisaram que, apesar da adição de coberturas a óxidos metálicos na pretensão de se alterar seu ponto isolétrico e dotá-los de potencial eletrocinético suficiente em condições fisiológicas (pH = 7), a síntese por coprecipitação implicaria no enxerto de moléculas de Dmsa à superfície particulada (**Figura 45**), e isso disponibilizaria grupos para a reação cruzada entre coberturas de partículas distintas e grupos hidrossolúveis; a síntese por decomposição térmica implicaria em reações de troca entre oleato e Dmsa, com ligação cruzada (pontes dissulfeto) laterais entre moléculas da mesma cobertura, disponibilizando apenas grupos para interação com o meio; já o citrato, esse apenas disponibilizaria ácido carboxílico, tendo mecanismo meramente eletrostático.



Complemente-se que [MEDDA et al \(2015\)](#) indicaram que a mobilidade da albumina sérica bovina em condições fisiológicas dependeria dos íons presentes na solução. Para ânions, ambos os princípios da polarização (força de dispersão iônica) e da afinidade pela água (hidratação; íons cosmotrópicos ou ordenadores = fortemente hidratados e pouco polarizantes; íons caotrópicos ou desordenadores = fracamente hidratados e muito polarizantes) atuariam conjuntamente e na mesma direção. Desta forma, os grupos proteicos carregados positivamente se comportariam como caotrofos e interagiriam preferencialmente com ânions caotrópicos e altamente polarizados, aumentando a repulsão e a hidrosolubilidade; com os cátions, os princípios atuariam em direções contrárias. Assim, em pH acima do ponto isoelétrico, os ânions (coions) continuariam sendo adsorvidos na superfície proteica, negativamente carregada, a uma extensão maior do que os cátions (contra-íons). [GALHARDO \(2009\)](#) sumariza íons e seus efeitos em proteínas (**Figura 46**).



E, suplemente-se que o meio de cultivo celular empregado (LHC9) é desprovido de fonte proteica (exceto traços de hormônios ou antibióticos); os sais prevalentes são NaCl,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$ ; os tampões são bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e HEPES ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ); e a solubilização desses sais libera íons e aumenta a força iônica no meio (**Figura 47**). Destaque-se que o meio LHC basal (que entra na composição final) é uma modificação do meio MCDB 151 – a concentração de aminoácidos é duplicada, a concentração de  $\text{CaCl}_2$  é aumentada e a osmolaridade é reduzida ([LECHNER & LaVECK, 1985](#)).

LHC-9 MEDIUM <sup>a</sup>			MODIFICATIONS OF MCDB 151 STOCKS FOR LHC BASAL MEDIUM		
Component <sup>b</sup>	Amount (ml)	Concentration in Medium	MCDB 151 Stock	Concentrations in MCDB 151	Concentrations in LHC basal
LHC basal medium	500.00		Stock 1		
Stock 4 <sup>c</sup>	5.00		Arginine · HCl	1.0 mM	2.0 mM
Stock 11 <sup>c</sup>	0.50		Histidine · HCl · H <sub>2</sub> O	80.0 μM	160.0 μM
Calcium stock	0.35	0.11 mM <sup>d</sup>	Isoleucine allo-free	15.0 μM	30.0 μM
Insulin stock	1.25	0.87 μM; 5 ug/ml	Leucine	0.5 mM	1.0 mM
HC stock	0.01	0.2 μM; 0.72 ug/ml	Lysine · HCl	0.1 mM	0.2 mM
EGF stock	0.50	0.825 nM; 5 ng/ml	Methionine	30.0 μM	60.0 μM
TF stock	1.00	0.125 uM; 10 μg/ml	Phenylalanine	30.0 μM	60.0 μM
P/E stock	2.50	0.5 uM of P & E, each	Threonine	0.1 mM	0.2 mM
Epi stock	0.25	2.7 μM; 0.5 μg/ml	Tryptophane	15.0 μM	30.0 μM
RA stock <sup>e</sup>	0.05	0.33 nM; 0.1 μg/ml	Tyrosine	15.0 μM	30.0 μM
T <sub>3</sub> stock <sup>e</sup>	0.05	10 nM; 6.5 ng/ml	Valine	0.3 mM	0.6 mM
Trace elements solution	5.00	see Table 4	Choline	0.1 mM	0.2 mM
Gentamycin <sup>g</sup>	0.50	50.0 μg/ml	Serine	0.6 mM	1.2 mM
BPE/ <sup>h</sup>	2.50	35.0 μg/ml; 0.5%	NaCl	130.0 mM	104.0 mM
			HEPES	28.0 mM	22.9 mM
			Sodium bicarbonate	14.0 mM	11.9 mM

SOLUTIONS			
Stock (Concentration)	Component	Co.; Cat #	Amount
LHC basal	LHC basal medium	I3; Special order	500.0 ml
Stock 4	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2; I-146	0.012 g
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2; M-87	12.200 g
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2; C-79	0.441 g
	HCl (concs)	2; ΔA-144	0.5 ml
	H <sub>2</sub> O (culture grade)		to 1.0 liter
Stock 11	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2; Z-68	0.863 g
	H <sub>2</sub> O (culture grade)		to 1.0 liter
Calcium stock (116 mM)	CaCl <sub>2</sub> (anhydrous)	2; C77	1.29 g
	H <sub>2</sub> O (culture grade)		100.0 ml

Figura 47. Composição do meio de cultivo LHC9. Fonte: [LECHNER & LaVECK \(1985\)](#).

Portanto, têm-se as hipóteses de que poderíamos ter presenciado os seguintes eventos em nossos experimentos *in vitro*: (1) **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cp** inicialmente teria adsorvido albumina sérica bovina em sua superfície, mas, após a redispersão em meio de cultivo, o mecanismo eletrostérico poderia ter padecido de desorção competitiva, com posterior filtragem (*screen*) e interação com ânions de menor raio iônico hidratado (Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), e, finalmente, a predominância de forças atrativas hidrofóbicas e de van der Waals; ou poderia ter ocorrido a interação predominante dos sítios proteicos com íons cosmotrópicos altamente hidratados e que reduziram sua solubilidade; (2) **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpCit** não teria adsorvido albumina e a carga negativa teria sido contrabalanceada pelos íons Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, com supressão ou compressão da dupla camada e predominância de forças atrativas; (3) **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpDmsa** não teria adsorvido albumina, a carga negativa teria sido neutralizada, da mesma forma que teria ocorrido com o citrato, sem prejuízo da eventual formação de

ligações cruzadas (pontes de sulfeto) entre as coberturas de diferentes partículas ou da predominância de forças atrativas; (iv) **MnFe2O4TdCit** e **MnFe2O4TdDmsa** teriam tido comportamento aparentemente dessemelhante, mas isso não afastaria a possibilidade da coexistência dos outros fatores citados nos respectivos nanomateriais contrapartes, mas em ordem ou magnitude distintas, de sorte que a relativa estabilidade na presença de meio de cultivo seria potencialmente atribuível ao tratamento prévio com albumina.

Por fim, uma inferência explanatória da diferença de comportamento no meio de cultivo entre os nanomateriais sintetizados por diferentes vias poderia ser a característica física distintiva – a morfologia.

Enquanto as nanopartículas esféricas (isotrópicas) teriam permitido uma melhor interação com a albumina, aquelas em bastão (anisotrópicas), não, de modo que poderia ter havido preclusão do benefício trazido pela adição de albumina. E isso poderia ser aditivamente explicado pela interferência dessa morfologia quanto à densidade de ligação das coberturas na superfície particulada (isto é, quanto à eficiência da estabilização) e a disponibilidade de sítios superficiais não ligados aos agentes estabilizadores ou da exposição de grupos funcionais dessas moléculas ao meio de cultivo (maiores hidratação, permeação de íons, etc). E isso é reiterado por [NEAGU \*et al\* \(2017\)](#), [NGUYEN & LEE \(2017\)](#) e [DOANE \*et al\* \(2012\)](#), que declaram que a interpretação da interação nanomaterial-meio biológico deverá sempre considerar as propriedades físicas e químicas das duas fases, pois a formação e a composição da coroa são diretamente afetadas pelas características constitutivas do nanomaterial (tamanho, forma, curvatura e carga da superfície, solubilidade, a presença de agentes funcionalizantes, eficiência da cobertura) e do meio (componentes, temperatura, pH, tempo de residência).

E, como anteriormente mostrado nos resultados da análise estatística dos ensaios biológicos, houve uma marcada interação entre a via de síntese, a cobertura e a viabilidade celular, de relevância tanto estatística quanto biológica; mas a qual não se refletiu simetricamente nos parâmetros genotóxicos, devido tanto à distinção de mecanismos de toxicidade quanto ao modelamento dos demais fatores do tratamento (os ensaios de genotoxicidade tiveram seus fatores “Concentração” e “Tempo” delimitados pela viabilidade celular).

## 6.2. Ensaios biológicos com os nanomateriais

A inteligência consolidada e disponibilizada no *PubMed* referente à toxicidade de ferrita de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) está resumida nas **Tabelas 10 a 12**. Como se pode notar do compilado, o conhecimento a respeito dessa classe de nanomateriais ainda é limitado, e, por causa da ampla dissonância (entre as vias de síntese, as formas de apresentação, as linhagens celulares, os regimes de tratamento, os protocolos experimentais, e demais outros inúmeros fatores, explícitos e implícitos), as informações demonstradas apenas repercutem como análise qualitativa e balizadora de discussão, sendo descabida qualquer pretensão de comparação mais formal ou direta (**Tabela 10**). Ainda, são mais raros os artigos em modelos *in vivo* (**Tabela 11**). Ademais, inexistente anterioridade referencial *in vitro* sobre os efeitos genotóxicos carboxilato de ferrita de manganês, comparativamente, de sorte que se remete a modelo ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) já testado e comercializado para fins biomédicos análogos (**Tabela 12**).

E, na intenção de se manter a integridade da linearidade lógica anteriormente traçada nas análises fatoriais, tal baliza será à guisa dos fatores explicadores dos resultados anteriormente citados.

Os dados fatorados no **ensaio de viabilidade celular** reiteram fatos paradigmáticos: a concentração e o tempo (elementos do regime de tratamento) estão sempre contidos em delineamentos experimentais mais complexos e reflexos da realidade que se intenta compreender. Revisitando Paracelsus, [GRANDJEAN \(2016\)](#) reescreve implicitamente sua máxima, para adotar uma abordagem holística, segundo a qual apenas a dose (ou concentração) não faz o veneno. De fato, os fatores delineados podem operar e cooperar na mesma direção deletéria (toxicologicamente relevante), de modo a abarcar uma composição não apenas monofatorial – “dose-resposta”, “tempo-resposta” -, mas, também, “dose(e)tempo-resposta”, e por aí vai. E isso conforma a explicação dos achados biológicos.

Quando considerado apenas o fator “**Concentração**”, o efeito biológico foi significativo apenas naquelas muito altas (**179 e 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$** ), e para os seguintes materiais: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**, **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** e **Dmsa**. E, quando esse fator foi relevante, o fator “**Tempo**” também o foi, especialmente após **24 horas** de exposição, em comparação com 6 horas, mas não com 48 horas. E, ambos os fatores também interagiram (“**Concentração e Tempo**”), isto é, operaram na mesma direção: para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit** e **Dmsa** a interação foi estatística e biologicamente relevante, e para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa** foi biologicamente relevante, mas, em todos os casos, apenas para aquela(s) maior(es) concentrações, de modo que nas menores

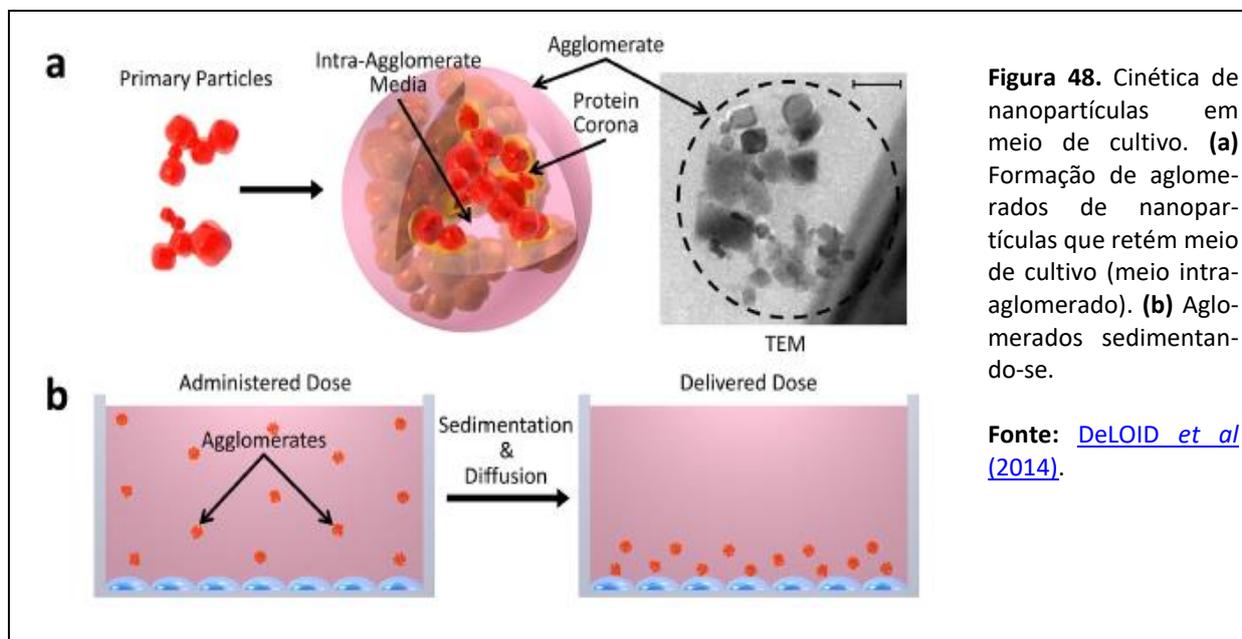
(< 179  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), tanto os fatores “Concentração” e “Tempo” quanto sua interação foram irrelevantes e não afetaram a viabilidade. Por outro lado, para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**, apenas a interação foi relevante e só para a maior concentração, indicando que, apesar dos fatores serem individualmente irrelevantes, eles interagiram na maior concentração, e apenas nela.

E esses achados também são coerentes com a análise multifatorial. Se: (i) o fator “**Cobertura**”, considerado de forma apartada, também foi relevante; (ii) o fator “**Síntese**” não foi importante; e (iii) o efeito biológico foi importante para nanomateriais totalmente contrapostos [MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa (x) MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit] –; logo, fica evidente que essa situação só poderia ser explicada pela interação significativa da via de síntese com os demais fatores. Decerto, o fator “Cobertura” foi importante para ambas as vias (coprecipitação e decomposição térmica), e o fator “Síntese” interagiu, concomitantemente, com todos os demais na redução da viabilidade celular.

Considerando-se todos os pontos acima colocados, é evidenciada a importância de um mecanismo (ou mecanismos) de ação que evoluiu com a **temporalidade** e a **dosimetria**, e que concatenou a interação de todos os fatores experimentais. Ainda, é oportuno se trazer que [LISON et al \(2014\)](#) relembram a necessidade de se conceituar corretamente a concentração como sendo aquela biologicamente associada ao efeito estudado e a qual se remeta àquela biologicamente efetiva, seja intracelularmente (biodisponível, agindo via mecanismos primários e diretos), seja extracelularmente (indisponível, mas agindo por mecanismos primários indiretos). Desta feita, faz-se necessário evoluir a discussão para elencar possíveis mecanismos de ação sobre a viabilidade celular (e sobre a genotoxicidade).

Em primeiro lugar, trata-se dos possíveis **mecanismos indiretos**. [CASEY et al \(2008\)](#) demonstraram que dois tipos de nanotubos de carbono de paredes únicas foram capazes de sequestrar, por adsorção, nutrientes essenciais do meio para as células A549, causando a redução da proliferação celular, de forma diretamente relacionada à área superficial do nanomaterial. Ainda, a desestabilização do coloide em meio de cultivo sem adição de soro (LHC9) e a massiva aglomeração das nanopartículas é um fenômeno amplamente conhecido ([SKULAND et al, 2014](#)) e diretamente dependente da área de superfície. Ademais, [DeLOID et al \(2014\)](#) demonstram que, quando um nanomaterial é adicionado a meio de cultivo, formam-se aglomerados que aprisionam grandes quantidades de meio (intra-aglomerado; **Figura 48**). Igualmente, a literatura também referencia que a ferrita de manganês é usada em remediação ambiental, para a remoção de vários elementos químicos em meio aquoso,

por adsorção superficial ([HU et al, 2017](#)). E, pela massiva aglomeração demonstrada nas imagens tiradas das células binucleadas no teste do micronúcleo (**Figura 40**) e nos dados do diâmetro hidrodinâmico no meio de cultivo (**Tabela 3**), e, num cenário de evolução temporal (fator “Tempo”) e de sobrecarga de nanomaterial (fator “Concentração”), esses substratos poderiam ser sequestrados em momento de franca atividade celular (tráfego intracelular de aglomerados, digestão em endossomos e lisossomos, destinação intracelular dos íons liberados, reparação de danos a proteínas e ácidos nucleicos, entre outros). Some-se a isso que a massiva deposição dos aglomerados sobre as células componentes de cultivo celular não tridimensional poderia bloquear física e quimicamente os mecanismos de internalização de nutrientes (bloqueio estérico de canais, sequestro eletrostático e osmótico de íons, etc), conduzindo a desnutrição ou ao estadiamento celular não proliferativo.



**Figura 48.** Cinética de nanopartículas em meio de cultivo. **(a)** Formação de aglomerados de nanopartículas que retêm meio de cultivo (meio intra-aglomerado). **(b)** Aglomerados sedimentando-se.

**Fonte:** [DeLOID et al \(2014\)](#).

Também, há que se considerar que, diferentemente do que se conhece e se espera da anatase ([Di BUCCHIANICO et al, 2016](#)), a ferrita de manganês não apresenta evidência de qualquer atividade intrínseca eletroquímica ou fotocatalítica, propriedades necessárias para a ocorrência de reações de redução do oxigênio ou de reações de evolução do oxigênio (ou outras), que produzam espécies reativas e que sejam fator de confundimento em ensaios de viabilidade ou de genotoxicidade ([KIRKLAND et al, 2007](#)); isto é, isoladamente, o espinélio de manganês seria eletricamente inativo, porque os baixos potenciais de valência na borda das bandas reduziria o desempenho da conversão fotoelétrica e, por causa disso, esse nanomaterial geralmente teria suas propriedades concorrendo aditiva ou sinergicamente

com as de outros nanomateriais, na forma de nanoestruturas conjugadas ou compostas, como o nitreto de carbono grafítico ([WANG et al, 2017](#)). Identicamente, não apresenta hidrosolubilidade ou libera íons metálicos ativos e reconhecidamente genotóxicos ou com valência ou especiação necessárias para a ocorrência de reações tipo Fenton ou para mobilização transmembrana por mecanismos passivos; ou seja, não é análoga ao óxido de zinco, que prontamente se dissolve na presença de fosfato ([HERRMANN et al, 2014](#)).

Quanto aos potenciais **mecanismos diretos** de toxicidade, a biodisponibilidade foi comprovada pela internalização (**Figura 24**); todos os nanomateriais estariam residindo no compartimento intracelular em todos os pontos temporais estudados. Assim, tornar-se-ia defensável se postular a primazia de um componente cinético. A exposição excessiva a aglomerados extensivos (fator “Concentração”), acrescida da influência cronológica (fator “Tempo”), indicaria a redução da viabilidade para as maiores concentrações majoritariamente após 24 horas de tratamento, com tendência de estagnação e não redução significativa após 48 horas, exceto para  $MnFe_2O_4TdCit$  (na maior concentração). Portanto, indicariam uma possível sobrecarga e uma saturação dos mecanismos de endocitose, representada pela interação desses fatores nas maiores concentrações. Daí a possível aplicabilidade, por analogia, do paradigma da toxicidade por sobrecarga de partículas ([DUFFIN et al, 2007](#)) e de saturação em altas concentrações ([WITTMACK et al, 2012](#)), a qual não pode ser previamente descartada ([GUÉRARD et al, 2015](#)).

Segundo [WILHELM et al \(2002\)](#), maguema sintetizada por coprecipitação e funcionalizada com Dmsa (esférica e potencial zeta negativo) teve internalização bifásica (ligação com a membrana celular, por adsorção inespecífica, e internalização, por endocitose pela via da clatrina), para células HeLa e RAW264.7 cultivadas com soro; a partir das premissas de que certa linhagem teria capacidades finitas de internalização, já que a endocitose consumiria parte da membrana a ser recomposta, comprovaram que a internalização seria delimitada pela saturação dos locais de ligação a membrana; cada local seria catiônico e associado a um grande aglomerado de nanopartículas (*cluster*) e seria delimitado pela repulsão dos sítios eletronegativos circunjacentes; por fim, concluíram que o fator crítico seria a carga, e não a natureza da cobertura, já que não houve diferença se a eletronegatividade superficial tenha sido dotada por Dmsa ou por citrato. Lembra-se que a endocitose é um processo ativo e consome energia ([SINGH et al, 2009](#)).

Uma vez internalizados os aglomerados, torna-se plausível a dissolução dos nanomateriais em meio ácido característico dos endossomos tardios e lisossomos, já que sua instabilidade nessa situação é conhecida para os óxidos de ferro sintetizados pelas duas vias (coprecipitação – [TOURINHO et al, 1990](#); decomposição térmica – [MAZUEL et al, 2016](#)). E, tendo em vista a possível saturação da internalização após 24 horas de exposição, sua redução poderia estar sendo compensada pela progressão da dissociação, o que explicaria a manutenção do nível de redução da viabilidade após 48 horas. E, como já revisado, um dos principais mecanismos de toxicidade dessa classe de nanomateriais é, exatamente, a ação desses íons liberados no compartimento intracelular ([SINGH et al, 2010](#); [MAGDOLENOVA et al, 2014](#); [GOLBAMAKI et al, 2015](#))

Já o fator “**Cobertura**” foi relevante por causa da sua contribuição para ambas as vias de síntese, mas deve ser analisado em conjunção com o fator “Síntese” e a interação desse com os demais fatores ([ZHU et al, 2012](#)). Como discutido na seção anterior a respeito da caracterização e do comportamento dos nanomateriais no meio, a capacidade e a densidade das coberturas, associadas à morfologia e a capacidade de interação com a albumina sérica bovina, poderiam explicar a interação dos fatores e os resultados biológicos obtidos.

Agora se adentra na discussão dos resultados do **ensaio do cometa** (dano do ácido desoxirribonucleico). O pouco que se pode acrescentar ao já discutido, no que couber, é pontual. O fator “**Concentração**” foi significativo apenas para dois nanomateriais: **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cp** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdDmsa**; mas, nos dois casos, houve também a ascendência do fator “**Experimento**”, essencialmente para as concentrações que foram estatisticamente significativas (256 µg.mL<sup>-1</sup> e 204,8 µg.mL<sup>-1</sup>); desse modo, os achados não foram conclusivos, uma vez que não se pôde discernir se se tratariam de variações associadas unicamente à reprodutibilidade ou se seriam, genuinamente, relativas ao cultivo celular; e, mesmo que se desconsiderassem esses fatos, para ambos os nanomateriais o achado foi positivo apenas para o primeiro tempo de tratamento; e, como não se repetiu no percorrer da exposição, careceria de qualquer significância biológica, até porque os danos moleculares teriam sido efetivamente reparados e não se refletiram no aumento significativo da frequência de aneugênese ou clastogênese cromossômica no teste do micronúcleo. A única outra concentração estatisticamente significativa (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cp** – 102,4 µg.mL<sup>-1</sup>) representou dano inferior ao observado para 6 horas de tratamento, o que também perfeitamente achado sem relevância biológica.

O único resultado importante, do ponto de vista biológico, foi a repercussão consistente do fator “**Tempo**” para ambos os nanomateriais cobertos com citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpCit** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdCit**), e para todas as concentrações, indicando um efeito sustentado, mesmo que sem relevância estatística no regime de tratamento empregado. E isso foi consistente e coerente com o resultado da análise multifatorial, que apontou que: apenas o fator “**Tempo**”, isoladamente, foi relevante; que sua interação foi importante juntamente com o fator “**Cobertura**”, apenas reiterando que o tempo foi relevante apenas para os nanomateriais cobertos com citrato; e o fator “**Concentração**” e sua interação com a cobertura de Dmsa sofreu das mesmas limitações quanto à repetição experimental.

E a análise de qualidade da replicação experimental detectou que, apesar dela não ter sido realizada em conformidade com o esperado estatisticamente para o tratamento por 6 horas com **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdCit**, esse achado não contribuiu suficientemente para a detecção de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o respectivo controle negativo, e sequer teve qualquer relevância biológica.

No que se refere ao **teste do micronúcleo**, não há o que se rediscutir, postas todas as hipóteses levantadas anteriormente na discussão do ensaio do cometa. O próprio delineamento experimental já precluiu a ocorrência de mecanismo secundário de ação (monocultivo de uma linhagem celular, sem cocultura com linhagem celular da via inflamatória). E foram fornecidas as referências de inocorrência de efeito primário indireto e a prova de internalização das nanopartículas antes da adição de citocalasina-B (6 horas de tratamento; **Figura 24**), sustentando assim a ausência de efeito genotóxico estrutural ou numérico importantes (clastogenia ou aneuploidia). Mas destaque-se que o efeito citostático observado para **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>CpDmsa** e **MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>TdCit**, nas maiores concentrações, também foi estritamente coerente com os resultados de redução da viabilidade celular pela quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina, fato também postulador de possível mecanismo indireto de citotoxicidade.

Por fim, os resultados obtidos de redução de até 77% da viabilidade pelo ensaio luminométrico e os fatores envolvidos guarda relativa e aparente semelhança de magnitude com algumas linhagens celulares e formas de apresentação de ferrita de manganês referenciadas na literatura (**Tabela 10**). O mesmo se nota para o potencial de micronucleação (**Tabela 12**). Por outro lado, no que se refere ao ensaio do cometa, as nanopartículas de ferrita de manganês estudadas teriam causado efeito menor (**Tabela 12**).

**Tabela 10.** Ensaios de viabilidade celular *in vitro* em diversas linhagens celulares submetidas a distintos regimes de tratamento, com as respectivas nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), e os principais fatores de variação do efeito. (continua)

Sistema	Nano	Regime	Resultado				Referência	
Linhagem	Síntese	Concentração	Tempo	Ensaio	Apresentação do nanomaterial	Viabilidade	Fatores	Autor(es)
HeLa	Sq	25 - 150 µg.mL-	12 - 24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PVP	↓ ≈ 20%	Concentração + Tempo	<a href="#">WANG et al (2018)</a>
HepG2	Cp	5 - 20 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + A_Cit	↓ ≈ 55%	Concentração	<a href="#">SHARMILADEVI et al (2017)</a>
		5 - 20 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @ SiO <sub>2</sub>	↓ ≈ 10%	Concentração	
MDA-MB 231	Td	100 - 1.500 µg.mL-	24 - 72h	WST-1	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + Dmsa	↓ ≈ 20%	Concentração + Tempo	<a href="#">OH et al (2016)</a>
		100 - 1.500 µg.mL-	24 - 72h	WST-1	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + Quitosana	↓ ≈ 8,5%	Concentração	
4T1	A s-g	20 - 320 µg.mL-	24 - 72h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	I <sub>C50</sub> = 171	Concentração + Tempo	<a href="#">KANAGESAN et al (2016)</a>
HeLa	Td	5 - 200 µg.mL-	12 - 24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + Go	↓ ≈ 15%	Concentração	<a href="#">YANG et al (2016)</a>
L929		5 - 200 µg.mL-	12 - 24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + Go	↓ ≈ 18%	Concentração	
RAW 264.7	Sig	250 - 750 µg.mL-	12h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + A_Cit + Cm-p5	↓ ≈ 66%	Concentração	<a href="#">LOPEZ-ABARRATEGUI et al (2016)</a>
U-87 MG	Td	0,1 - 20 µg.mL-	24h	CITO	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (micelas anfifílicas)	↑ ≈ 10%	Tempo	<a href="#">DEMILLO et al (2015)</a>
HEK-293		0,1 - 20 µg.mL-	24h	CITO	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (micelas anfifílicas)	↓ ≈ 10%	Concentração	
MCF7	Cp	25 - 250 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + CMC + PINIPAM + PGA + AF	≈ 0%	Nenhum	<a href="#">PATRA et al (2015)</a>
PC-3	Td	0,1 - 100 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PEG	↓ ≈ 25%	Concentração + Tamanho	<a href="#">LEAL et al (2015)</a>
		0,1 - 100 µg.mL-	24h	LDH	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PEG	↓ ≈ 8%	Concentração + Tamanho	
L929	Td	7,8125 - 500 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	↓ ≈ 10%	Concentração	<a href="#">YANG et al (2015)</a>
A549	Td	25 - 800 µg.mL-	24 - 48h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	↓ ≈ 70%	Concentração + Tamanho	<a href="#">ZHAO et al (2015)</a>
Balb/3T3	Cp	5 - 100 µg.mL-	24 - 48h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + A_Cit	↓ ≈ 50%	Concentração + Tempo	<a href="#">BELLUSCI et al (2014)</a>
		5 - 100 µg.mL-	72h	CFA	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + A_Cit	↓ ≈ 85%	Concentração	
HepG2	St	10 <sup>-7</sup> - 0,41 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + GGA	↓ ≈ 20%	Concentração	<a href="#">YANG et al (2013)</a>
MCF7		10 <sup>-7</sup> - 0,41 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + GGA	↓ ≈ 20%	Concentração	

**HeLa:** câncer cervical humano. **HepG2:** câncer hepático humano. **MDA-MB 231:** câncer de mama humano. **4T1:** câncer de mama murino. **L929:** fibroblasto murino. **RAW 264.7:** macrófago murino. **U-87 MG:** glioblastoma primário humano. **HEK-293:** rim embrionário humano. **MCF7:** câncer de mama humano. **PC-3:** câncer de próstata humano. **A549:** adenocarcinoma epitelial alveolar humano. **Balb/3T3:** fibroblasto murino. **Sq:** sonoquímica. **Cp:** coprecipitação. **Td:** decomposição térmica. **A s-g:** autocombustão sol-gel. **Sig:** sigilosa (não revelada). **St:** solvotérmica. **MTT:** ensaio do metil tiazolil tetrazólio. **WST-1:** ensaio do iodo-fenil nitro-fenil tetrazólio. **LDH:** ensaio da lactato desidrogenase. **CFA:** ensaio de formação de colônia. **PVP:** polivinilpirrolidona. **A\_Cit:** ácido cítrico. **@ SiO<sub>2</sub>:** casca de dióxido de silício. **Dmsa:** ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico. **Go:** óxido de grafeno. **Cm-p5:** peptídeo antifúngico. **CMC:** carboximetilcelulose. **PINIPAM:** poli-N-isopropilacrilamida. **PGA:** ácido poliglutâmico. **AF:** ácido fólico. **PEG:** polietilenoglicol. **GGA:** ácido galactosilglucônico. ↓ ≈: redução aproximada da viabilidade. I<sub>C50</sub> = concentração que causou uma redução de 50% da viabilidade em relação ao grupo controle negativo normalizado.

**Tabela 10.** Ensaios de viabilidade celular *in vitro* em diversas linhagens celulares submetidas a distintos regimes de tratamento, com as respectivas nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), e os principais fatores de variação do efeito. (conclusão)

Sistema	Nano	Regime	Resultado				Referência	
Linhagem	Síntese	Concentração	Tempo	Ensaio	Apresentação do nanomaterial	Viabilidade	Fatores	Autor(es)
HeLa	St	5 - 20 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @ Si + NH <sub>2</sub> + Fo + RTIC	≈ 0%	Nenhum	<a href="#">SAHOO et al (2014)</a>
		5 - 20 µg.mL-	24h	MTT	Sem cobertura	≈ 0%	Nenhum	
L929		5 - 20 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @ Si + NH <sub>2</sub> + Fo + RTIC	↓ ≈ 10%	Nenhum	
		5 - 20 µg.mL-	24h	MTT	Sem cobertura	↓ ≈ 10%	Nenhum	
BxPC-3	Cp	3,125 - 500 µg.mL-	96h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + COOH	↓ ≈ 15%	Concentração	<a href="#">WANG et al (2013)</a>
RAW264.7	St	10 <sup>-7</sup> - 0,41 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PS	I <sub>C50</sub> = 97	Concentração + Carga	<a href="#">YANG et al (2012)</a>
		10 <sup>-7</sup> - 0,41 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PS + COOH <sup>-</sup>	I <sub>C50</sub> = 108	Concentração + Carga	
		10 <sup>-7</sup> - 0,41 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PS + NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	I <sub>C50</sub> = 13,5	Concentração + Carga	
MCF-7	Td	0,03125 - 2 mM Fe	24h	WST-8	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + PEG (nanoemulsão)	↓ ≈ 10%	Concentração	<a href="#">PENG et al (2012)</a>
PAE/KDR	Td	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>4</sup> nM Fe	72h	WST-8	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + VEGF	I <sub>C50</sub> = 50,3	Concentração	<a href="#">CHO et al (2011)</a>
HeLa	Td	10 - 200 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @ DA	↓ ≈ 12%	Concentração	<a href="#">HU et al (2011)</a>
HeLa	Td	10 - 200 µg.mL-	24h	MTT	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + TEG	↓ ≈ 20%	Concentração	<a href="#">YANG et al (2010)</a>

**HeLa:** câncer cervical humano. **L929:** fibroblasto murino. **BxPC-3:** câncer de pâncreas. **RAW 264.7:** macrófago murino. **MCF7:** câncer de mama humano. **PAE/KDR:** endotélio aórtico porcino. **St:** solvotérmica. **Cp:** coprecipitação. **Td:** decomposição térmica. **MTT:** ensaio do metil tiazolil tetrazólio. **WST-8:** ensaio do iodo-fenil nitro-fenil tetrazólio. **@ Si:** casca silanizada. **NH<sub>2</sub>:** amina. **Fo:** folato. **RTIC:** isotiocianato de rodamina b. **PS:** polisorbato 80. **COOH-:** ácido carboxílico. **PEG:** polietilenoglicol. **VEGF:** fator de crescimento endotelial vascular. **@ DA:** casca de dopamina. **TEG:** tetraetilenoglicol. ↓ ≈: redução aproximada da viabilidade. I<sub>C50</sub> = concentração que causou uma redução de 50% da viabilidade em relação ao grupo controle negativo normalizado.

**Tabela 11.** Ensaios de biodistribuição e de toxicologia sistêmica *in vivo* em modelo murino tratado com nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

Sistema	Nanomaterial	Regime	Resultado			Referência	
Modelo	Síntese	Via	Tempo*	Ensaio	Apresentação do nanomaterial	Achados	Autor(es)
camundongo	Cp	Intraperitoneal (1x0,5-0,0005 M)	1-2d	Citogenético	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + Cit	Hipoploidia	<a href="#">LACAVA et al (1999)</a>
camundongo	Cp	Intraperitoneal (1x0,5-0,0005 M)	1-2d	Citogenético	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + Tar	Aberração cromossômica	<a href="#">LACAVA et al (1999)</a>
camundongo	St	Intracaudal (1x100 µL)	7d	Histopatologia	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @ Si + NH <sub>2</sub> + Fo + RTIC	Nenhum	<a href="#">SAHOO et al (2014)</a>
camundongo	Cp	Intracaudal (1x100 µmol)	21d	Histopatologia	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + A_Cit	Nenhum	<a href="#">BELLUSCI et al (2014)</a>

**Cp:** coprecipitação. **St:** solvotérmica. \*: tempo de recuperação após administração sistêmica no compartimento central (dias). **Cit:** citrato. **Tar:** tartarato. **@ Si:** casca silanizada. **NH<sub>2</sub>:** amina. **Fo:** folato. **RTIC:** isotiocianato de rodamina b. **A\_Cit:** ácido cítrico.

**Tabela 12.** Ensaios de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* em diversas linhagens celulares submetidas a distintos regimes de tratamento, com as respectivas nanopartículas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), e os principais fatores de variação do efeito.

Sistema	Nanomaterial		Regime		Ensaio	Resultado			Referência
	Modelo	Síntese	Apresentação	Concentração		Tempo	Geno	Fatores	
BEAS-2B	S-A	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	40 - 80 µg.mL <sup>-1</sup>	4h	Cometa	(+) 80 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 13% DNA	Concentração	<a href="#">KAIN et al (2012)</a>
A549	S-A	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	40 - 80 µg.mL <sup>-1</sup>	4h	Cometa	(+) 80 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 13% DNA	Concentração + Tamanho	<a href="#">KARLSSON et al (2009)</a>
A549	S-A	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2 - 80 µg.mL <sup>-1</sup>	4h	Cometa	(-)	≈ 13% DNA	Nenhum	<a href="#">KARLSSON et al (2008)</a>
HEK-293	Cp	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10-70 µg.mL <sup>-1</sup>	0,5 - 1h	Cometa	(+) 10 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 40% DNA	Concentração + Tempo	<a href="#">GOMAA et al (2013)</a>
HPL			10-70 µg.mL <sup>-1</sup>	0,5 - 1h	Cometa	(+) 10 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 15% DNA	Concentração + Tempo	
L929	Cp	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	100-1000 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(-)	≈ 3% DNA	Carga + Tamanho	<a href="#">HONG et al (2011)</a>
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + TEOS	100-1000 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(-)	≈ 2,5% DNA	Carga + Tamanho	
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + APTMS	100-1000 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(+) 200 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 6,5% DNA	Carga + Tamanho	
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + TEOS + APTMS	100-1000 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(+) 200 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 5% DNA	Carga + Tamanho	
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + CIT	100-1000 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(+) 200 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 6% DNA	Carga + Tamanho	
A431	Cp	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	25-100 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(+) 25 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 10% DNA	Concentração	<a href="#">AHAMED et al (2013)</a>
A549			25-100 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Cometa	(+) 25 µg.mL <sup>-1</sup>	≈ 10% DNA	Concentração	
TK6	P-C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + AO	0,12 - 75 µg.cm <sup>-2</sup>	4h	Cometa	(+) 75 µg.cm <sup>-2</sup>	≈ 50% DNA	Concentração + Cobertura	<a href="#">ZUZANA et al (2011)</a>
SHE	S-A	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10-50 µg.cm <sup>-2</sup>	24h	Cometa	(-)	≈ 10% DNA	Concentração + Tamanho	<a href="#">GUICHARD et al (2012)</a>
			5-50 µg.cm <sup>-2</sup>	24h	Micronúcleo	(-)	≈ 3,5% MN	Concentração + Tamanho	
A549	S-A	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1 - 100 µg.cm <sup>-2</sup>	4h	Cometa	(+) 50 µg.cm <sup>-2</sup>	≈ 3,5% DNA	Concentração	<a href="#">KÖNCZÖL et al (2011)</a>
			1 - 100 µg.cm <sup>-2</sup>	24h	Micronúcleo	(+) 10 µg.cm <sup>-2</sup>	≈ 15% MN	Concentração	
MCL-5	L-S	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	1 - 100 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Micronúcleo	(-)	≈ 1% MN	Nenhum	<a href="#">SINGH et al (2012)</a>
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + DEX	1 - 100 µg.mL <sup>-1</sup>	24h	Micronúcleo	(-)	≈ 1% MN	Nenhum	
Camundongo	J-C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	IP: 1 - 3 mg	48h	Micronúcleo	(+) 3 mg	≈ 3% MN	Concentração	<a href="#">SONG et al (2012)</a>
Camundongo	Cp	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	IP: 15 - 125 mg	30h	Micronúcleo	(-)	≈ 2,5% MN	Nenhum	<a href="#">CHEN et al (2012)</a>
Camundongo	Cp	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> + PA	IV: 3.10 <sup>14</sup>	1 - 30d*	Micronúcleo	(+) 1d	≈ 6% MN (PCE)	Concentração + Tempo	<a href="#">SADEGHIANI et al (2005)</a>
			IV: 8.10 <sup>14</sup>	1 - 30d*	Micronúcleo	(+) 1-15d	≈ 10% MN (PCE)	Concentração + Tempo	

**BEAS-2B:** epitélio bronquial humano. **A549:** adenocarcinoma epitelial alveolar humano. **HEK-293:** rim embrionário humano. **HPL:** linfócitos periféricos humanos. **L929:** fibroblasto murino. **A431:** carcinoma epidermoide humano. **TK6:** linfoblastoide humano. **SHE:** células embrionárias de hamster sírio. **MCL-5:** linfoblastoide humano. **Cp:** coprecipitação. **S-A:** Sigma-Aldrich. **P-C:** PlasmaChem. **L-S:** Liquids Research. **J-C:** JEF Chemical. **TEOS:** tetraetoxissilano. **APTMS:** 3-aminopropiltriétoxissilano. **CIT:** citrato. **AO:** ácido oleico. **DEX:** dextran. **PA:** ácido poliaspártico. **IP:** intraperitoneal. **IV:** intravenoso (veia caudal). **% DNA:** intensidade ou % de DNA na cauda. **% MN:** frequência de micronucleação. **PCE:** eritrócitos policromáticos. \*: intervalo de tempo de recuperação ou pontos temporais de aferição (dias).

## 7. CONCLUSÃO

Os objetivos específicos foram cumpridos: as características essenciais e o comportamento das nanopartículas no meio de cultivo celular foram verificadas; todas as nanopartículas foram internalizadas pelas células após 6 horas de exposição; e nenhuma ferrita sintetizada por coprecipitação, sem cobertura ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Cp}$ ) ou com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-CpDmsa}$ ), e nenhuma sintetizada por decomposição térmica, com cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdDmsa}$ ), causou efeito citotóxico ou genotóxico significativo no tratamento com até  $153,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e por até 48 horas.

Esta é a primeira pesquisa a comparar os efeitos genotóxicos *in vitro* de nanopartículas de ferrita de manganês, com o mérito de ter realizado análise fatorial comparativa, a qual indicou que a citotoxicidade é influenciada pela concentração, pelo tempo de tratamento e pela cobertura das nanopartículas; ao passo que, em relação aos parâmetros genotóxicos, houve uma tendência de aumento do dano do ácido desoxirribonucleico causado pelas nanopartículas cobertas com o citrato, independentemente da via de síntese; também, não houve efeito clastogênico ou aneugênico significativo, de modo que a exposição aos nanomateriais testados não foi fator de risco para micronucleação (dano cromossômico).

Recomenda-se que estudos comparativos futuros sejam conduzidos com: (i) nanomaterial sintetizado por coprecipitação, tendo em vista o melhor custo-benefício; (ii) tratamento com a concentração máxima de  $153,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; (iii) período de exposição estendido para 48 e 72 horas (no ensaio do cometa) e para 12 e 24 horas (antes da adição de citocalasina B, no teste do micronúcleo); (iv) verificação de potenciais mecanismos de ação (estresse oxidativo e cinética de reação com nucleases, e hibridização fluorescente *in situ*), além de concorrentes ensaios multiparamétricos para citotoxicidade; (v) acompanhamento do tráfego e da transformação intracelulares; (vi) dosimetria efetiva; e (vii) especiação química, para testar a hipótese de liberação de íons de metais de transição e suas valências.

Em suma, os nanomateriais apresentam perfil toxicológico que justifica o prosseguimento de testes de maior complexidade em outros modelos *in vitro* correlacionados a outras vias de exposição (mononucleares periféricos de sangue humano) e em modelos animais (para se observar eventual toxicidade sistêmica ou por mecanismos secundários).

## 8. REFERÊNCIAS

ABROSHAN, E. et al. Novel magnetically separable  $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocomposite and its high photocatalytic degradation performance for organic dyes under solar-light irradiation. *Solar Energy Materials and Solar Cells*. 2018. 178:154-163.

AHAMED, M. et al. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Current Pharmaceutical Design*. 2013. (19) 37:6681-6690.

ALIMBA, C. G. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2016. 798:35-47.

ALVAREZ, S. W.; POSSEMATO, R. Leveraging the iron-starvation response to promote ferroptosis. *Oncotarget*. 2018. (9)13:10830.

AMOLI-DIVA, M. et al.  $\text{FeMn}_2\text{O}_4$  nanoparticles coated dual responsive temperature and pH-responsive polymer as a magnetic nano-carrier for controlled delivery of letrozole anti-cancer. *Nanomedicine Journal*. 2017. (4)4:218-223.

ANAND, V. et al. Drug loaded silica coated  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  ferromagnetic biomaterials for targeted cancer treatment. *AIP Conference Proceedings*. 2017. (1837)1:040009.

ANDREWS, E. B. Windows on a Lilliputian world: a personal perspective on the development of electron microscopy in the twentieth century. *Notes and Records of the Royal Society*. 2009. 63:169–181.

ANDUJAR, P. et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014. (11)1:23.

ANGOTZI, M. S. et al. Spinel Ferrite Core–Shell Nanostructures by a Versatile Solvothermal Seed-Mediated Growth Approach and Study of Their Nanointerfaces. *ACS Nano*. 2017. (11) 8:7889-7900.

ANSARI, M.; KHAN, S. Structural, electrical and optical properties of sol-gel synthesized cobalt substituted  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Physica B: Condensed Matter*. 2017. 520:21-27.

AREZES, J. et al. Non-transferrin-bound iron (NTBI) uptake by T lymphocytes: evidence for the selective acquisition of oligomeric ferric citrate species. *PLoS One*. 2013. (8)11:e79870.

ARSALANI, N. et al. Novel PANI/ $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocomposite for low-cost supercapacitors with high rate capability. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2018. (29)7:6077–6085

ASHWINI, K. et al. Synthesis and Characterization of as-formed and Calcined  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles: A comparative study of their Antibacterial Activities. *Materials Today: Proceedings*. 2017. (4)11:11902-11909.

ASIRI, S. et al. Hydrothermal synthesis of  $\text{Co}_y\text{Zn}_y\text{Mn}_{1-2y}\text{Fe}_2\text{O}_4$  nanoferrites: Magneto-optical investigation. *Ceramics International*. 2017. 44:5751-5759.

AZQUETA, A. et al. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011. (724)1:41-45.

AZQUETA, A. et al. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics*. 2014. 5:288.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*. 2013. (87)6:949-968.

AZQUETA, A.; DUSINSKA, M. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Frontiers in Genetics*. 2015. 6:239.

BABAEI, B. et al. Magnetically Reusable  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  Nanoparticles Modified with Oxo-Peroxo Mo (VI) Schiff-Base Complexes: A High Efficiency Catalyst for Olefin Epoxidation under Solvent-Free Conditions. *Chemistry Select*. 2018. (3)10:2877-2881.

BACH, L. G. et al. Enhanced adsorption of methylene blue onto graphene oxide-doped  $X\text{Fe}_2\text{O}_4$  ( $X = \text{Co}, \text{Mn}, \text{Ni}$ ) nanocomposites: kinetic, isothermal, thermodynamic and recyclability studies. *Research on Chemical Intermediates*. 2018. (44)3:1661-1687.

BACRI, J-C. et al. Ionic ferrofluids: a crossing of chemistry and physics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1990. (85)1-3:27-32.

BANERJEE, A. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of PEGylated first-row transition metal ferrite nanoparticles as T2 contrast agents for high-field MRI. *RSC Advances*. 2017. (7)61:38125-38134.

BARBOSA, L. R. S. et al. The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *Biophysical Journal*. 2010. 98:147–157.

BECKMAN, R. A. et al. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*. 1985. (24)21:5810-5817.

BEHERA, C.; CHOUDHARY, R. N. P. Electrical and multiferroic characteristics of PVDF- $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocomposites. *Journal of Alloys and Compounds*. 2017. 727:851-862.

BELLUSCI, M. et al. Biodistribution and acute toxicity of a nanofluid containing manganese iron oxide nanoparticles produced by a mechanochemical process. *International Journal of Nanomedicine*. 2014. (17)9:1919–1929.

BEVAN, R. et al. Setting evidence-based occupational exposure limits for manganese. *Neurotoxicology*. 2017. 58:238-248.

BHOWMIK, K. L. et al. Synthesis of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Mn}_3\text{O}_4$  magnetic nano-composites with enhanced properties for adsorption of Cr (VI): artificial neural network modeling. *Water Science and Technology*. 2017. (76)12:3368-3378.

BHUYAN, B. et al. A novel  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ /graphitic carbon nitride ( $g\text{-C}_3\text{N}_4$ ) nanocomposites as efficient magnetically retrievable catalyst in crossed aldol condensation. *Materials Letters*. 2018. 218:99-102.

BIOLA-CLIER, M. et al. Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis*. 2016. (32)1:161-172.

BÖHME, U.; SCHELER, U. Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR. *Chemical Physics Letters*. 2007. (435)4–6:342-345.

BRONZE-UHLE, E. S. et al. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. *Nanotechnology. Science and Applications*. 2017. 10:11–21.

BURSTEN, J. R. et al. Conceptual Analysis for Nanoscience. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2016<sup>1</sup>. 7:1917–1918.

BURSTEN, J. R. Smaller than a Breadbox: Scale and Natural Kinds. *The British Journal for the Philosophy of Science*. 2016<sup>2</sup>. (69)1:1-23.

CANU, I. G. et al. Human exposure to carbon-based fibrous nanomaterials: a review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2016. (219)2:166-175.

CARTER, S. B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*. 1967. (213)5073:261.

CASAVOLA, M. et al. Fabrication of Fischer–Tropsch catalysts by deposition of iron nanocrystals on carbon nanotubes. *Advanced Functional Materials*. 2015. (25)33:5309-5319.

CASEY, A. et al. Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. *Toxicology Letters*. 2008. (179)2:78-84.

CATALÁN, J. et al. Analysis of nanoparticle-induced DNA damage by the comet assay. In: *Genotoxicity and DNA repair*. Humana Press: NY. 2014. p. 241-268.

CHAKRABORTY, I. et al. Surface engineered magneto fluorescent  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles in the realm of biomedical applications. *Surfaces and Interfaces*. 2017. 9:154-159.

CHEN, D. et al. Biocompatibility of magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2012. 7:4973.

CHEN, R. et al. Magnetically recyclable self-assembled thin films for highly efficient water evaporation by interfacial solar heating. *RSC Advances*. 2017. (7)32:19849-19855.

CHEN, Y. et al. Stimuli-responsive nanocomposites for magnetic targeting synergistic multimodal therapy and T1/T2-weighted dual-mode imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017. (13)3:875-883.

CHEN, Y-X. et al. Adsorption of Methylene Blue by Halloysite/MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanocomposites. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2017. (17)9:6489-6496.

CHEN, Z. P. et al. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008. (316)1-3:210-216.

CHIANG, C-L. et al. Synthesis and characterization of magnetic zinc and manganese ferrite catalysts for decomposition of carbon dioxide into methane. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017. (42)34:22123-22137.

CHO, E. J. et al. Sensitive angiogenesis imaging of orthotopic bladder tumors in mice using a selective magnetic resonance imaging contrast agent containing VEGF121/rGel. *Investigative Radiology*. 2011. (46)7: 441-449.

CHO, S-H et al. Photothermal-modulated drug delivery and magnetic relaxation based on collagen/poly ( $\gamma$ -glutamic acid) hydrogel. *International Journal of Nanomedicine*. 2017. 12:2607.

COLLINS, A. R. et al. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair*. 1995. (336)1:69-77.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1997<sup>1</sup>. (375)2:183-193.

COLLINS, A. R. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1997<sup>2</sup>. (30)2:139-146.

COLLINS, A. R. et al. Sensitive detection of DNA oxidation damage induced by nanomaterials. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. 107:69-76.

COWIE, H. et al. Suitability of human and mammalian cells of different origin for the assessment of genotoxicity of metal and polymeric engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2015. (9)S1:57-65.

CRUZ, M. M. et al. Enhanced magnetic hyperthermia of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*. 2017. 703:370-380.

CURTIS, J. et al. Nanotechnology and nanotoxicology. *Toxicological Reviews*. 2006. (25)4:245-260.

DADARLAT, D. et al. Photopyroelectric Characterization of Magnetic Nanofluids. Influence of Type and Size of Nanoparticles on the Thermal Parameters. *International Journal of Thermophysics*. 2017. (38)6:86.

DAFFÉ, N. et al. Nanoscale Distribution of Magnetic Anisotropies in Bimagnetic Soft Core–Hard Shell  $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CoFe}_2\text{O}_4$  Nanoparticles. *Advanced Materials Interfaces*. 2017. (4)22:1-27.

DeLOID, G. et al. Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry. *Nature Communications*. 2014. 5:3514.

DEMILLO, V. et al. Zwitterionic amphiphile coated magnetofluorescent nanoparticles—synthesis, characterization and tumor cell targeting. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015. (3)42:8328-8336.

DEVI, E. C.; SOIBAM, I. Effect of Zn doping on the structural, electrical and magnetic properties of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Indian Journal of Physics*. 2017. (91)8:861-867.

Di BUCCHIANICO, S. et al. Genotoxicity of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis*. 2016. (32)1:127-137.

DOAK, S. H. et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis*. 2009. (24)4:285-293.

DOAK, S. H. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012. (745)1:104-111.

DOAK, S. H. et al. Genotoxicity and cancer. In: *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials. Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health*. 2017. Academic Press: NY. p. 423-445.

DOAK, S. H.; DUSINSKA, M. NanoGenotoxicology: present and the future. *Mutagenesis*. 2016. (32)1:1-4.

DOANE, T. L. et al. Nanoparticle  $\zeta$ -potentials. *Accounts of Chemical Research*. 2011. (45)3:317-326.

DONALDSON, K.; POLAND, C. A. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013. (24)4:724-734.

DUFFIN, R. et al. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation Toxicology*. 2007. (19)10:849-856.

DUSINSKA, M. et al. Towards an alternative testing strategy for nanomaterials used in nanomedicine: lessons from NanoTEST. *Nanotoxicology*. 2015. (9)S1:118-132.

EL YAMANI, N. et al. In vitro genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. *Mutagenesis*. 2016. (32)1:117-126.

ELLIOTT, K. C. Ethical and societal values in nanotoxicology. In: *In Pursuit of Nanoethics*. Springer: Dordrecht. 2014. p. 147-163.

EL-SAYED, M. A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts of Chemical Research*. 2001. (34)4:257-264.

ERSSON, C.; MÖLLER, L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis*. 2011. (26)6:689-695.

EVANS, S. J. et al. Critical review of the current and future challenges associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*. 2016. (32)1:233-241.

FALCK, G. C. M. et al. Genotoxic effects of nanosized and fine TiO<sub>2</sub>. *Human & Experimental Toxicology*. 2009. (28)6-7:339-352.

FAUCONNIER, N. et al. Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1997. (194)2:427-433.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*. 1993. (101)S3:101.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000. (455)1:81-95.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1985. (147)1-2:29-36.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003. (534)1:65-75.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011. (26)1:125-132.

FILIPE, V. et al. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*. 2010. (27)5:796-810.

FRÖHLICH, E.; SALAR-BEHZADI, S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014. (15)3:4795-4822.

FROLOVA, L. A.; DERHACHOV, M. P. The Effect of Contact Non-equilibrium Plasma on Structural and Magnetic Properties of  $Mn_xFe_{3-x}O_4$  Spinels. *Nanoscale Research Letters*. 2017. (12)1:505.

GALHARDO, K. S. Proposta para a disciplina de QFL2453-Físico-Química Experimental. 2009. (Acessado em 5/5/2018. Disponível em: [http://www2.iq.usp.br/pos-graduacao/images/documentos\\_pae/1sem2009/quimica\\_organica/quimica\\_analitica/kelly.pdf](http://www2.iq.usp.br/pos-graduacao/images/documentos_pae/1sem2009/quimica_organica/quimica_analitica/kelly.pdf)).

GHANBARIAN, M. et al. Potential of amino-riched nano-structured  $MnFe_2O_4@cellulose$  for biosorption of toxic Cr (VI): Modeling, kinetic, equilibrium and comparing studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. 104:465-480.

GOLBAMAKI, N. et al. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale*. 2015. (7)6:2154-2198.

GOLSEFIDI, M. A. et al. Facile synthesis of  $MnFe_2O_4$  nanoparticles and investigation of various reductant and capping agents on their size and morphology. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2017. (28)2:1378-1385.

GOMAA, I. O. et al. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2013. (7)3:116-123.

GOMES, A. S. L.; MELO, C. P. A iniciativa brasileira em nanociência e nanotecnologia. *Parcerias Estratégicas*. 2004. (9)18:105-135.

GONZALEZ, L. et al. Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review. *Nanotoxicology*. 2008. (2)4:252-273.

GONZALEZ, L. et al. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*. 2011. (26)1:185-191.

GRANDJEAN, P. Paracelsus revisited: the dose concept in a complex world. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2016. (119)2:126-132.

GUERARD, M. et al. Assessment of mechanisms driving non-linear dose–response relationships in genotoxicity testing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2015. 763:181-201.

GUICHARD, Y. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Annals of Occupational Hygiene*. 2012. (56)5:631-644.

GUO, P. et al. Electrochemical properties of colloidal nanocrystal assemblies of manganese ferrite as the electrode materials for supercapacitors. *Journal of Materials Science*. 2017. (52)9:5359-5365.

HAGUENAU, F. et al. Key events in the history of electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis*. 2003. (9)2:96-138.

HAMMAD, M. et al. Synthesis and Characterization of Bi-Magnetic Core/Shell Nanoparticles for Hyperthermia Applications. *IEEE Transactions on Magnetics*. 2017. (53)4:1-6.

HARRIS, V. G. et al. Recent advances in processing and applications of microwave ferrites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009. (321)14:2035-2047.

HARRIS, V. G. Modern microwave ferrites. *IEEE Transactions on Magnetics*. 2012. (48)3:1075-1104.

HARTMANN, N. B. et al. Techniques and protocols for dispersing nanoparticle powders in aqueous media—is there a rationale for harmonization?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2015. (18)6:299-326.

HE, F. et al. Preparation of bifunctional hollow mesoporous Fe<sub>0</sub>@C@MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> as Fenton-like catalyst for degradation of Tetrabromobisphenol A. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2017. 80:553-562.

HEIKHAM, F. D.; THIYAM, D. S. Fabrication of Spherical Magneto-Luminescent Hybrid MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@YPO<sub>4</sub>:5Eu<sup>3+</sup> Nanoparticles for Hyperthermia Application. *Chemistry Select*. 2017. (2)31:10010-10019.

HERRMANN, R. et al. Rapid degradation of zinc oxide nanoparticles by phosphate ions. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2014. 5:2007.

HESAMPOUR, M. et al. Synthesis, characterization and application of a  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ @poly(o-toluidine) nanocomposite for magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Journal of Chemistry*. 2017. (41)21:12910-12919.

HONDA, A. et al. Effects of air pollution-related heavy metals on the viability and inflammatory responses of human airway epithelial cells. *International Journal of Toxicology*. 2015. (34)2:195-203.

HONG, S. C. et al. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine*. 2011. 6:3219.

HU, H. et al. Surfactant-controlled morphology and magnetic property of manganese ferrite nanocrystal contrast agent. *Nanotechnology*. 2011. (22)8:085707.

HU, Q. et al. Adsorption behavior and mechanism of different arsenic species on mesoporous  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  magnetic nanoparticles. *Chemosphere*. 2017. 181:328-336.

HUANG, X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003. (533)1:153-171.

HUANG, Y. et al. Catalytic effect of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  on dehydrogenation kinetics of  $\text{NaAlH}_4$ - $\text{MgH}_2$ . *RSC Advances*. 2017. (7)55:34522-34529.

HUK, A. et al. Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. *Mutagenesis*. 2014. (30)1:85-88.

HULLA, J. E. et al. Nanotechnology: History and future. *Human & Experimental Toxicology*. 2015. (34)12:1318-1321.

HUSSAIN, S. M. et al. At the crossroads of nanotoxicology in vitro: past achievements and current challenges. *Toxicological Sciences*. 2015. (147)1:5-16.

IACOBAZZI, V.; INFANTINO, V. Citrate—new functions for an old metabolite. *Biological Chemistry*. (395)4:387-399.

IRANMANESH, P. et al. Modified structural and magnetic properties of nanocrystalline  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  by pH in capping agent free co-precipitation method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017. 425:31-36.

JACINTHA, A. M. et al. Synthesis and comparative studies of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles with different natural polymers by sol–gel method: structural, morphological, optical, magnetic, catalytic and biological activities. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2017. (7)4:375-387.

JANG, J. et al. Critical enhancements of MRI contrast and hyperthermic effects by dopant-controlled magnetic nanoparticles. *Angewandte Chemie*. 2009. (121)7:1260-1264.

KAFSHGARI, L. A. et al. Fabrication and investigation of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{MWCNTs}$  nanocomposite by hydrothermal technique and adsorption of cationic and anionic dyes. *Applied Surface Science*. 2017<sup>1</sup>. 419:70-83.

KAFSHGARI, L. A. et al. Modeling and optimization of Direct Red 16 adsorption from aqueous solutions using nanocomposite of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{MWCNTs}$ : RSM-CCRD model. *Journal of Molecular Liquids*. 2017<sup>2</sup>. 233:370-377.

KAIN, J. et al. DNA damage induced by micro and nanoparticles—interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis*. 2012. (27)4:491-500.

KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2005. (57)4:547-583.

KANAGESAN, S. et al. Synthesis, Characterization and in vitro evaluation of manganese ferrite ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) nanoparticles for their biocompatibility with murine breast cancer cells (4T1). *Molecules*. 2016. (21)3:312.

KARLSSON, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. (398)2:651-666.

KARLSSON, H. L. et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*. 2008. (21)9:1726-1732.

KARLSSON, H. L. et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano-and micrometer size. *Toxicology Letters*. 2009. (188)2:112-118.

KARLSSON, H. L. et al. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity?. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2015. (56)2:82-96.

KASAMA, D. Y. Estruturação do conhecimento e relações semânticas: uma ontologia para o domínio da nanociência e nanotecnologia. Dissertação de Mestrado em Estudos Lingüísticos. 2009. São José do Rio Preto. 180 p. (Acessado em 11/05/2018. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86567/kasama\\_dy\\_me\\_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86567/kasama_dy_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)).

KAUR, G. et al. Affected energy metabolism under manganese stress governs cellular toxicity. *Scientific Reports*. 2017. (7)1:11645.

KE, Y. et al. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation*. 1988. (38)1:60-66.

KHILARI, S.; PRADHAN, D. MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@nitrogen-doped reduced graphene oxide nanohybrid: an efficient bifunctional electrocatalyst for anodic hydrazine oxidation and cathodic oxygen reduction. *Catalysis Science & Technology*. 2017. (7)24:5920-5931.

KIM, J. et al. Continuous O<sub>2</sub>-evolving MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle-anchored mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy in hypoxic cancer. *Journal of the American Chemical Society*. 2017. (139)32:10992-10995.

KIM, K. et al. Magnetically Separable Hollow MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Polyaniline Composite Nanofibers: Highly Enhanced Visible Light Photodegradation of Methyl Orange. *Science of Advanced Materials*. 2017. (9)11:1993-1997.

KINNULA, V. L. et al. Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1994. (11)5:568-576.

KIRKLAND, D. et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007. (628)1:31-55.

KIRKLAND, D. et al. A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011. (721)1:27-73.

KOMBALIAH, K. et al. A Green approach: synthesis, characterization and opto-magnetic properties of  $Mg_xMn_{1-x}Fe_2O_4$  spinel nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2017. (28)14:10321-10329.

KÖNCZÖL, M. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF- $\kappa$ B. *Chemical Research in Toxicology*. 2011. (24)9:1460-1475.

KOOTI, M. et al. H3PW12O40 anchored on graphene-grafted silica-coated  $MnFe_2O_4$  as magnetic catalyst for Mannich reaction. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2018. (15)4:943-953.

KOPPEN, G. et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. 2017. (32)3: 397–408.

KREYLING, W. G. et al. Differences in the biokinetics of inhaled nano-versus micrometer-sized particles. *Accounts of Chemical Research*. 2012. (46)3:714-722.

KULKARNI, S. et al.  $MnFe_2O_4$ : Synthesis, morphology and electrochemical properties. *AIP Conference Proceedings*. 2017. (1837)1:040044.

KUMAR, A. et al. Metal Oxide Nanoparticles Elicit Geno-toxic Responses in Mammalian Cells: A Critical Review. *Nanoscience and technology for mankind*. National Academy of Sciences. 2014. Allahabad: IN. p. 160-194.

KUMAR, G. et al. Superparamagnetic behaviour and evidence of weakening in super-exchange interactions with the substitution of  $Gd^{3+}$  ions in the Mg–Mn nanoferrite matrix. *Materials Research Bulletin*. 2015. 63:216-225.

KURTAN, U. et al. Enhanced antibacterial performance of  $Fe_3O_4$ –Ag and  $MnFe_2O_4$ –Ag nanocomposites. *Bulletin of Materials Science*. 2017. (40)1:147-155.

KUZMA, J.; BESLEY, J. C. Ethics of risk analysis and regulatory review: From bio-to nanotechnology. *Nanoethics*. 2008. (2)2:149-162.

KWON, J. M. et al. Facile hydrothermal synthesis of cubic spinel  $AB_2O_4$  type  $MnFe_2O_4$  nanocrystallites and their electrochemical performance. *Applied Surface Science*. 2017. 413:83-91.

LACAVA, Z. G. M. et al. Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999. (194)1-3:90-95.

LACAVA, Z. G. M. et al. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999. 201(1-3):431-434.

LADINO, E. A. H. et al. Detection of magnetic nanoparticles with a large scale AC superconducting susceptometer. *Superconductor Science and Technology*. 2017. (30)8:084007.

LAI, W. et al. Enhanced All-Optical Modulation of Terahertz Waves on the Basis of Manganese Ferrite Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2017. (121)39:21634-21640.

LANDSIEDEL, R. et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009. (681)2:241-258.

LEAL, M. P. et al. Long-circulating PEGylated manganese ferrite nanoparticles for MRI-based molecular imaging. *Nanoscale*. 2015. (7)5:2050-2059.

LECHNER, J. F. et al. Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro*. 1982. (18)7:633.

LECHNER, J. F. et al. Induction of squamous differentiation of normal human bronchial epithelial cells by small amounts of serum. *Differentiation*. 1984. (25)1-3:229-237.

LECHNER, J. F.; LAVECK, M. A. A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *Journal of Tissue Culture Methods*. 1985. (9)2:43-48.

LI, N. et al. Interaction between nano-anatase  $\text{TiO}_2$  and liver DNA from mice in vivo. *Nanoscale Research Letters*. 2010. (5)1:108.

LI, Y. et al. A spray pyrolysis synthesis of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{SnO}_2$  yolk/shell composites for magnetically recyclable photocatalyst. *Materials Letters*. 2017<sup>1</sup>. 199:135-138.

LI, Y. et al. Fabrication of sewage sludge-derived magnetic nanocomposites as heterogeneous catalyst for persulfate activation of Orange G degradation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2017<sup>2</sup>. 529:856-863.

LINDBERG, H.K. et al. Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters*. 2009. 186: 166–173.

LINDBERG, H. K. et al. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. *Toxicology*. 2013. (313)1:24-37.

LISON, D. et al. Paracelsus in nanotoxicology. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014. (11)1:35.

LIU, S. et al. Biomacromolecule-Assisted Synthesis and Electrocapacitive Behavior of Manganese Ferrite Nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*. 2017. 12:11244-11255.

LONG, X-Y. et al. Spinel-type manganese ferrite ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) microspheres: A novel affinity probe for selective and fast enrichment of phosphopeptides. *Talanta*. 2017. 166:36-45.

LOPEZ-ABARRATEGUI, C. et al. The intrinsic antimicrobial activity of citric acid-coated manganese ferrite nanoparticles is enhanced after conjugation with the antifungal peptide Cm-p5. *International Journal of Nanomedicine*. 2016. 11:3849.

LOUREIRO, H. et al. Role of nanogenotoxicology studies in safety evaluation of nanomaterials. In: *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*. 2015. Elsevier: NY. p. 263-287.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008. (23)3:171-182.

MA, Y. et al. Lignosulfonate-Assisted Hydrothermal Synthesis of Mesoporous  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  for Pb (II) Removal. *Nano*. 2018. (13)3:185002.

MACLEAN-FLETCHER, S.; POLLARD, T. D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell*. 1980. (20)2:329-341.

MADHURA, T. R. et al. Nanosheet-like manganese ferrite grown on reduced graphene oxide for non-enzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2017. 792:15-22.

MAGDOLENOVA, Z. et al. Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2012. (75)13-15:800-806.

MAGDOLENOVA, Z. et al. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014. (8)3:233-278.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. NanoSight NTA Analytical Software - user manual. 2012. v. 2.3. 88 p. (Acessado em: 11/05/2018; Disponível em: [https://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/nanoparticle-analysis/NanoSight\\_NS300\\_Software\\_Guide.pdf](https://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/nanoparticle-analysis/NanoSight_NS300_Software_Guide.pdf)).

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Zetasizer Nano - user manual. 2013. v. 1.1. 250 p. (Acessado em: 11/05/2018; Disponível em: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>).

MAPPES, T. et al. The invention of immersion ultramicroscopy in 1912—the birth of nanotechnology?. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012. (51)45:11208-11212.

MARCOVICH, A.; SHINN, T. Forma, epistemologia e imagem nas nanociências. *Scientiae Studia*. 2009. (7)1:41-62.

MARTINEZ-VARGAS, S. et al. Arsenic adsorption on cobalt and manganese ferrite nanoparticles. *Journal of Materials Science*. 2017. (52)11:6205-6215.

MARTINS, F. H. et al. Local Structure of Core–Shell  $\text{MnFe}_2\text{O}_4+\delta$ -Based Nanocrystals: Cation Distribution and Valence States of Manganese Ions. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2017. (121)16:8982-8991.

MARTUS, H-J. et al. Summary of major conclusions from the 6th international workshop on genotoxicity testing (IWGT), Foz do Iguaçu, Brazil. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2015. 783:1-5.

MASHADI; Y.; MULYAWAN, A. Microwave absorption study of manganese ferrite in x-band range prepared by solid state reaction method. *Jurnal Teknologi*. 2018. (80)2:147-151.

MASSART, R. et al. New trends in chemistry of magnetic colloids: polar and non-polar magnetic fluids, emulsions, capsules and vesicles. 1995. *Brazilian Journal of Physics*. (25)2:135-141.

MASSART, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetics*. 1981. (17)2:1247-1248.

MASSART, R.; CABUIL, V. Synthèse en milieu alcalin de magnétite colloïdale : contrôle du rendement et de la taille des particules. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*. 1987. (84)7-8:967-973.

MATATAGUI, D. et al. Magnonic sensor array based on magnetic nanoparticles to detect, discriminate and classify toxic gases. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017. 240:497-502.

MAYNARD, R. L. Nano-technology and nano-toxicology. *Emerging Health Threats Journal*. 2012. (5)1:17508.

MAZUEL, F. et al. Massive intracellular biodegradation of iron oxide nanoparticles evidenced magnetically at single-endosome and tissue levels. *ACS Nano*. 2016. (10)8:7627-7638.

MDLALOSE, W. B. et al. Effect of chitosan coating on the structural and magnetic properties of  $MnFe_2O_4$  and  $Mn_{0.5}Co_{0.5}Fe_2O_4$  nanoparticles. *AIP Advances*. 2018. (8)5:056726.

MEDDA, L. et al. The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific. *Chemistry Communications*. 2015. 51:6663-6666.

MEENA, S. et al. Optical, Electrochemical and Photocatalytic Properties of Sunlight Driven Cu Doped Manganese Ferrite Synthesized By Solution Combustion Synthesis. *Materials Today: Proceedings*. 2017. (4)11:11773-11781.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. *Nanociências e nanotecnologia. Parcerias Estratégicas*. 2004. (9)18:9-22.

MEO, M. et al. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1991. (260)3:295-306.

MIHALACHE, R. et al. Occupational exposure limits for manufactured nanomaterials, a systematic review. *Nanotoxicology*. 2017. (11)1:7-19.

MONTFERRAND, C. et al. Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection. *Acta Biomaterialia*. 2012. (9)4:6150-6157.

MOORE, T. L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*. 2015. (44)17:6287-6305.

MOUSSA, R. S. et al. Ironing out the role of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 in cancer: Novel iron chelating agents to target p21 expression and activity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018. Em publicação.

MUMTAZ, S. et al. Facile method to synthesize dopamine-capped mixed ferrite nanoparticles and their peroxidase-like activity. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2017. 50(11)11LT02.

NANOGENOTOX. WP5: In vitro methods for genotoxicity testing. 2013. (Acessado em: 14/5/2018. Disponível em: <https://www.anses.fr/en/content/nanogenotox-documents>).

NAVEED, M. et al. Conduction mechanism and impedance spectroscopy of  $(\text{MnFe}_2\text{O}_4)_x/\text{CuTi-1223}$  nanoparticles-superconductor composites. *Journal of Alloys and Compounds*. 2017. 712:696-703.

NEAGU, M. et al. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Archives of Toxicology*. 2017. (91)3:1031–1048.

NELSON, R. L. Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutrition Reviews*. 2001. (59)5:140-148.

NEYESTANI, M. R. et al. A magnetized graphene oxide modified with 2-mercaptobenzothiazole as a selective nanosorbent for magnetic solid phase extraction of gold (III), palladium (II) and silver (I). *Microchimica Acta*. 2017. (184)8:2871-2879.

NGUYEN, V. H.; LEE, B. J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *International Journal Nanomedicine*. 2017. 12:3137–3151.

NOAH, T. L. et al. The response of a human bronchial epithelial cell line to histamine: intracellular calcium changes and extracellular release of inflammatory mediators. *American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology*. 1991. (5)5:484-492.

NOBEL PRIZE ORGANIZATION. 2014. Richard Zsigmondy – Biographical. (Acessado em 11/5/2018. Disponível em: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1925/zsigmondy-bio.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1925/zsigmondy-bio.html))

NORDMANN, A. *Converging Technologies – Shaping the Future of European Societies. Foresighting the New Technology Wave*. 2004. European Commission: Luxembourg. 63 p.

NORPPA, H. et al. Nano-specific genotoxic effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2011. (7)1:19-19, 2011.

NORPPA, H.; FALCK, G. C-M. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003. (18)3:221-233.

NUNES, A.D.C. et al. Manganese ferrite-based nanoparticles induce ex vivo, but not in vivo, cardiovascular effects. *International Journal of Nanomedicine*. 2014. 9:3299-3312.

OBERDÖRSTER, G. et al. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 2005<sup>1</sup>. (113)7:823.

OBERDÖRSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*. 2005<sup>2</sup>. (2)1:8.

OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*. 2010. (267)1:89-105.

OH, Y. et al. In vitro study on apoptotic cell death by effective magnetic hyperthermia with chitosan-coated MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. *Nanotechnology*. 2016. (27)11:115101.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2010. OECD: Brussels.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Draft Guidance Document on the use of OECD Test Guidelines on genotoxicity testing for manufactured nanomaterials. 2014. OECD: Brussels.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984. (123)1:291-298.

PARK, J. et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials*. 2004. (3)12:891-895.

PARK, Y. et al. Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate in vitro model to study heavy metals induced carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015. (287)3:240-245.

PASCAL, L. E.; TESSIER, D. M. Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters*. 2004. (147)2:143-151.

PATRA, S. et al. Dual-responsive polymer coated superparamagnetic nanoparticle for targeted drug delivery and hyperthermia treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015. (7)17:9235-9246.

PAZIK, R. et al. Non-contact  $Mn_{1-x}Ni_xFe_2O_4$  ferrite nano-heaters for biological applications—heat energy generated by NIR irradiation. *RSC Advances*. 2017. (7)29:18162-18171.

PENG, E. et al. Synthesis of manganese ferrite/graphene oxide nanocomposites for biomedical applications. *Small*. 2012. (8)23:3620-3630.

PETRI-FINK, A. et al. Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008. (68)1:129-137.

PFUHLER, S. et al. Genotoxicity of nanomaterials: refining strategies and tests for hazard identification. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2013. (54)4:229-239.

PRESUME, M. et al. Exposure to metal oxide nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Nanotoxicology*. 2016. (10)10:1535-1544.

RAHMANIA, A. et al. Removal/separation of Co (II) ion from environmental sample solutions by MnFe. 2017. 89:250–257.

RALAND, R. D. et al. Heating efficiency and correlation between the structural and magnetic properties of oleic acid coated  $MnFe_2O_4$  nanoparticles for magnetic hyperthermia application. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2017. (50)32:325004.

RASHID, Z. et al. Effective surface modification of  $MnFe_2O_4@SiO_2@PMIDA$  magnetic nanoparticles for rapid and high-density antibody immobilization. *Applied Surface Science*. 2017. 426:1023-1029.

RASHMI, S. K. et al. Influence of  $Sm^{3+}$  ions on structural, optical and solar light driven photocatalytic activity of spinel  $MnFe_2O_4$  nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry*. 2017. 255:178-192.

RASMUSSEN, K. et al. Review of achievements of the OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials' Testing and Assessment Programme. From exploratory testing to test guidelines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016. 74:147-160.

REDDEL, R. R. et al. Patente US4885238 A. 1987. WO1989003994A1. (Acesso em: 14/05/2018. Disponível em: [https://www.lens.org/lens/patent/US\\_4885238\\_A](https://www.lens.org/lens/patent/US_4885238_A)).

REDDEL, R. R. et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research*. 1988. (48)7:1904-1909.

REDDY, D. H. K. et al. Fabrication of Stable and Regenerable Amine Functionalized Magnetic Nanoparticles as a Potential Material for Pt (IV) Recovery from Acidic Solutions. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017. (9)22:18650-18659.

RIBEIRO, L. R. et al. A importância da mutagênese ambiental. Em: *Mutagênese Ambiental*. 2003. ULBRA: Canoas. p. 22.

RIM, K. et al. Oxidative DNA damage from nanoparticle exposure and its application to workers' health: a literature review. *Safety and Health at Work*. 2013. (4)4:177-186.

ROCKFIELD, S. et al. Iron overload and altered iron metabolism in ovarian cancer. *Biological Chemistry*. 2017. (398)9:995-1007.

ROCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S. *Converging Technologies for Improving Human Performance: Nanotechnology, Biotechnology, Information Technology and Cognitive Science*. 2003. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 482 p.

ROCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S. *Managing Nano-Bio-Info-Cogno Innovations: Converging Technologies in Society*. 2006. Springer: Dordrecht. 379 p.

ROCO, M. C. et al. *Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Retrospective and Outlook*. 2010. Springer: Dordrecht. 614 p.

ROCO, M. C. et al. *Convergence of Knowledge, Technology, and Society: Beyond Convergence of Nano-Bio-Info-Cognitive Technologies*. 2013. WTEC: Lancaster. 450 p.

ROSZAK, J. et al. Effect of particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. *Mutation Research*. 2016. 805:7–18.

RUIZ, A. et al. Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014. (16)11:2589.

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. Em: DNA repair mechanisms. Eds: HANAWALT, P. C.; FRIEDBERG, E. C. 1978. Academic Press: NY. p. 465-468.

SADEGHIANI, N. et al. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005. 289:466-468.

SAHOO, B. et al. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014. 431:31-41.

SAHU, S. C. Nanotoxicology and Nanomedicine: A special issue of the Food and Chemical Toxicology - Editorial. *Food and Chemical Toxicology*. 2015. 85:1-2.

SANDSTRÖM, P. et al. Nonspecific and thiol-specific binding of DNA to gold nanoparticles. *Langmuir*. 2003. (19)18:7537-7543.

SANTAMARIA, A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. In: *Nanotoxicity*. 2012. Humana Press: Totowa. p. 1-12.

SAVOLAINEN, K. et al. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—a review. *Toxicology*. 2010. (269)2-3:92-104.

SHAHID, M. et al. Impacts of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Gd}^{3+}$  co-doping on structural, dielectric and magnetic properties of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles synthesized via micro-emulsion route. *Ceramics International*. 2017. (43)16:14096-14100.

SHAPOSHNIKOV, S. et al. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization - a review. *Mutagenesis*. 2009. (24)5:383-389.

SHARMILADEVI, P. et al. Effect of Mesoporous Nano Water Reservoir on MR Relaxivity. *Scientific Reports*. 2017. (7)1:11179-11185.

SI, C. et al. Mesoporous nanostructured spinel-type  $MFe_2O_4$  (M= Co, Mn, Ni) oxides as efficient bi-functional electrocatalysts towards oxygen reduction and oxygen evolution. *Electrochimica Acta*. 2017. 245:829-838.

SINGH, D. et al. Bench-to-bedside translation of magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2014. 9(4):501-516.

SINGH, N. et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009. (30)23-24:3891-3914.

SINGH, N. et al. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* 2010. (1)1:5358.

SINGH, N. et al. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2012. (33)1:163-170.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988. (175)1:184-191.

SKULAND, T. et al. Role of size and surface area for pro-inflammatory responses to silica nanoparticles in epithelial lung cells: importance of exposure conditions. *Toxicology in Vitro*. 2014. (28)2:146-155.

SONG, M. F. et al. Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2012. (50)3:211-216.

SOUSA, M. H. et al. New electric double-layered magnetic fluids based on copper, nickel, and zinc ferrite nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001. (105)6:1168-1175.

STEPHENSON, A. P. et al. Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. *Toxicology Letters*. 2013. (218)3:299-307.

STETEFELD, J. et al. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. 2016. (8)4:409-427.

STEVENS, R. G. et al. Body iron stores and the risk of cancer. *New England Journal of Medicine*. 1988. (319)16:1047-1052.

STOIA, M. et al.  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles as new catalyst for oxidative degradation of phenol by peroxydisulfate. *Journal of Environmental Sciences*. 2017. 53:269-277.

STONE, V. et al. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*. 2009. (39)7:613-626.

SU, H. et al. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *Journal of Applied Toxicology*. 2018. (38)1:3-24.

SUN, H. et al. Comparison of gene expression profiles in chromate transformed BEAS-2B cells. *PloS One*. 2011. (6)3:e17982.

SUN, S. et al. Monodisperse  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2004. (126)1:273-279.

SUN, Z. et al. In situ synthesis of magnetic  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ /diatomite nanocomposite adsorbent and its efficient removal of cationic dyes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2017. 71:501-509.

SZEKERES, M. et al. Chemical and colloidal stability of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles designed for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. (14)7:14550-14574.

TAN, C. et al. Efficient degradation of paracetamol with nanoscaled magnetic  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  as a heterogeneous catalyst of peroxymonosulfate. *Separation and Purification Technology*. 2017. 175:47-57.

TARALE, P. et al. Global DNA methylation profiling of manganese-exposed human neuroblastoma SH-SY5Y cells reveals epigenetic alterations in Parkinson's disease-associated genes. *Archives of Toxicology*. 2017. (91)7:2629-2641.

TESSIER, D. M.; PASCAL, L. E. Activation of MAP kinases by hexavalent chromium, manganese and nickel in human lung epithelial cells. *Toxicology Letters*. 2006. (167)2:114-121.

THYBAUD, V. et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007. (627)1:41-58.

TOURINHO, F. A. et al. Synthesis and magnetic properties of manganese and cobalt ferrite ferrofluids. *Progress in Colloid & Polymer Science*. 1989. 79:128-134.

TOURINHO, F. A. et al. Aqueous ferrofluids based on manganese and cobalt ferrites. *Journal of Materials Science*. 1990. (25)7:3249-3254.

VALES, G. et al. Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology*. 2015. (9)5:568-578.

VAN SON, T. et al. Photochemical Decoration of Silver Nanocrystals on Magnetic  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  Nanoparticles and Their Applications in Antibacterial Agents and SERS-Based Detection. *Journal of Electronic Materials*. 2017. (46)6:3412-3421.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2015. 6:1769.

VASYLKIV, O. et al. Synthesis of iron oxide nanoparticles with different morphologies by precipitation method with and without chitosan addition. 2016. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 24:489-494.

VELINOV, N. et al. Synthesis and Mössbauer spectroscopic investigation of copper-manganese ferrite catalysts for water-gas shift reaction and methanol decomposition. *Materials Research Bulletin*; 2017. 95:556-562.

VIPPOLA, M. et al. Preparation of nanoparticle dispersions for in-vitro toxicity testing. *Human & Experimental Toxicology*. 2009. (28)6-7:377-385.

WADEHRA, N. et al. Biocompatible ferrite nanoparticles for hyperthermia: effect of polydispersity, anisotropy energy and inter-particle interaction. *Materials Research Express*. 2017. (4)2:025037.

WANG, A. et al. A smart nanoporous theranostic platform for simultaneous enhanced MRI and drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013. 180:1-7.

WANG, G. et al. Synthesis and characterization of polymer-coated manganese ferrite nanoparticles as controlled drug delivery. *Applied Surface Science*. 2018. 428:258-263.

WANG, H. et al. Hydrothermal Synthesis of Nanooctahedra  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  onto the Wood Surface with Soft Magnetism, Fire Resistance and Electromagnetic Wave Absorption. *Nanomaterials*. 2017<sup>1</sup>. (7)6:118.

WANG, H. et al. Effects of monovalent and divalent metal cations on the aggregation and suspension of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles in aqueous solution. *Science of the Total Environment*. 2017<sup>2</sup>. 586:817-826.

WANG, X. et al. Visible-light-driven photocatalytic removal of antibiotics by newly designed  $\text{C}_3\text{N}_4@ \text{MnFe}_2\text{O}_4$ -graphene nanocomposites. *Journal of Hazardous Materials*. 2017. 336:81-92.

WEI, G. et al. Reversible control of the magnetization of spinel ferrites based electrodes by lithium-ion migration. *Scientific Reports*. 2017. (7)1:12554.

WILHELM, C. et al. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir*. 2002. (18)21:8148-8155.

WITTMACK, K. Excessive delivery of nanostructured matter to submerged cells caused by rapid gravitational settling. *ACS Nano*. 2011. (5)5:3766-3778.

WOODRUFF, R. S. et al. Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay. *Journal of Applied Toxicology*. 2012. (32)11:934-943.

WU, D. et al. Adsorptive removal of aqueous bezafibrate by magnetic ferrite modified carbon nanotubes. *RSC Advances*. 2017. (7)63:39594-39603.

WU, Q. et al. Novel Magnetic-Luminescent Janus Nanoparticles for Cell Labeling and Tumor Photothermal Therapy. *Small*. 2017. 13:39.

XIAO, F. et al. Study on the Performance of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  as Anode Material for Lithium-Ion Batteries Using Spent Alkaline Zn-Mn Batteries as Manganese Source. *International Journal of Electrochemical Science*. 2017. 12:11235-11243.

XU, J. et al. Dual Roles of Oxidative Stress in Metal Carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2017. (36)4:345-376.

YADAV, J. S. et al. Chromosome damage in lymphocytes of stainless steel welders. *International Journal of Human Genetics*. 2001. (1)3:195-202.

YAN, Y. et al. Carbon-coated  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticle hollow microspheres as high-performance anode for lithium-ion batteries. *Electrochimica Acta*. 2017. 246:43-50.

YANG, G. et al. A cheap and facile route to synthesize monodisperse magnetic nanocrystals and their application as MRI agents. *Dalton Transactions*. 2015. (44)1:247-253.

YANG, H. et al. Water-soluble superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Biomaterials*. 2010. (31)13:3667-3673.

YANG, Q. et al. Probing the Interaction of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques. *Journal of Physical Chemistry, B*. 2009. (113)30:10454–10458.

YANG, S. H. et al. Galactosylated manganese ferrite nanoparticles for targeted MR imaging of asialoglycoprotein receptor. *Nanotechnology*. 2013. (24)47:475103.

YANG, S. H. et al. Role of surface charge in cytotoxicity of charged manganese ferrite nanoparticles towards macrophages. *Nanotechnology*. 2012. (23)50:505702.

YANG, Y. et al. Graphene oxide/manganese ferrite nanohybrids for magnetic resonance imaging, photothermal therapy and drug delivery. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016. (30)6:810-822.

YANG, Y. et al. Mechanistic studies of mercury adsorption and oxidation by oxygen over spinel-type  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . *Journal of Hazardous Materials*. 2017. 321:154-161.

YANG, Z. et al. Hydrazine hydrate-induced hydrothermal synthesis of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles dispersed on graphene as high-performance anode material for lithium ion batteries. *Ceramics International*. 2017. (43)14:10905-10912.

YAWSON, R. M. An epistemological framework for nanoscience and nanotechnology literacy. *International Journal of Technology and Design Education*. 2012. (22)3:297-310.

YOUNIS, S. A.; MOUSTAFA, Y. M. Synthesis of urea-modified  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  for aromatic micro-pollutants adsorption from wastewater: mechanism and modeling. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2017. (19)2:527-540.

YU, S. et al. Albumin-coated SPIONs: An experimental and theoretical evaluation of protein conformation, binding affinity and competition with serum proteins. *Nanoscale*. 2016. (8)30:14393-14405.

ZAIDAN, A. et al. Folate receptor mediated in vivo targeted delivery of human serum albumin coated manganese ferrite magnetic nanoparticles to cancer cells. *Journal of Physics: Conference Series*. 2017. p. 012048.

ZAKHARCHEVA, K. A. et al. Cells resistant to toxic concentrations of manganese have increased ability to repair DNA. *Biochemistry (Moscow)*. 2017. (82)1:38-45.

ZHANG, C-Z et al. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*. 2015. (522)7555:179.

ZHANG, H. et al. Ultrasmall Ferrite Nanoparticles Synthesized via Dynamic Simultaneous Thermal Decomposition for High-Performance and Multifunctional T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *ACS Nano*. 2017. (11)4:3614-3631.

ZHANG, L. et al. Facile synthesis of hollow  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanoboxes based on galvanic replacement reaction for fast and sensitive VOCs sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018. 258:589-596.

ZHANG, Y. et al. Toxicity of dimercaptosuccinate-coated and un-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles towards aquatic organisms. *Environmental Science: Nano*. 2016. (3)4:754-767.

ZHAO, F.; KLIMECKI, W. T. Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model. *Journal of Applied Toxicology*. 2015. (35)8:945-951.

ZHAO, H. et al. In vitro toxicity evaluation of ultra-small  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M= Fe, Mn, Co) nanoparticles using A549 cells. *RSC Advances*. 2015. (5)84:68454-68460.

ZHAO, Y. et al. Activation of persulfate by magnetic  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ -bentonite for catalytic degradation of 2, 4-dichlorophenol in aqueous solutions. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2017. (33)3:415-421.

ZHIRONKIN, S. Al. et al. NBIC-Convergence of Machinery and Basic Technologies as the Ecological Factor of Wellbeing. *IOP Conference Series: Earth and: Environmental Science*. 2017. 50:1-8.

ZHOU, S-F. et al. Individual and simultaneous electrochemical detection toward heavy metal ions based on L-cysteine modified mesoporous  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  nanocrystal clusters. *Journal of Alloys and Compounds*. 2017. 721:492-500.

ZHOU, Y. et al. Spinel Manganese Ferrites for Oxygen Electrocatalysis: Effect of Mn Valency and Occupation Site. *Electrocatalysis*. 2018. (9)3:287-292.

ZHU, M. et al. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts of Chemical Research*. 2012. (46)3:622-631.

ZUZANA, M. et al. Safety assessment of nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity of metal nanoparticles in vitro. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2011. (7)1:20-21.

## 9. APÊNDICES

### 9.1. Síntese dos resultados e dados brutos

#### Ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina

**Quadro 3.** Síntese dos resultados do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

Item	N	Tempo	C <sup>M</sup>	Luminosidade (%) (média ± desvio padrão)					
				C <sup>0</sup> (0 mg.mL <sup>-1</sup> )	25,6 mg.mL <sup>-1</sup>	51,2 mg.mL <sup>-1</sup>	102,4 mg.mL <sup>-1</sup>	179,2 mg.mL <sup>-1</sup>	256 mg.mL <sup>-1</sup>
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - Cp	6	6h	107 ± 22	100 ± 13	119 ± 9	125 ± 7 <sup>G-H*</sup>	135 ± 4 <sup>G-H**</sup>	134 ± 7 <sup>G-H**</sup>	136 ± 8 <sup>G-H**</sup>
	6	24h	123 ± 12 <sup>t*</sup>	100 ± 17	140 ± 19 <sup>G-H*</sup>	134 ± 9 <sup>G-H*</sup>	128 ± 14	128 ± 11	121 ± 12
	6	48h	105 ± 12	100 ± 6	115 ± 10	109 ± 5	107 ± 3	103 ± 3	97 ± 6
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpCit	6	6h	93 ± 30	100 ± 19	99 ± 9	104 ± 9	117 ± 7	118 ± 11	119 ± 9
	6	24h	91 ± 25	100 ± 9	121 ± 30	112 ± 11	124 ± 16	108 ± 22	126 ± 20
	6	48h	99 ± 52	100 ± 5	108 ± 37	122 ± 10 <sup>G-H*</sup>	122 ± 9 <sup>G-H*</sup>	115 ± 9	111 ± 10
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdCit	6	6h	93 ± 30	100 ± 19	100 ± 11	98 ± 4	102 ± 17	107 ± 11	113 ± 7
	6	24h	91 ± 25	100 ± 9	102 ± 6	114 ± 12	94 ± 21	82 ± 5 <sup>D*/G-H*</sup>	50 ± 8 <sup>D***G-H**</sup>
	6	48h	99 ± 52	100 ± 5	121 ± 10 <sup>G-H*</sup>	118 ± 12	112 ± 5 <sup>G-H*</sup>	83 ± 5 <sup>D*/G-H**</sup>	26 ± 3 <sup>D***G-H***</sup>
Cit	4	6h	101 ± 41	100 ± 17	113 ± 16	108 ± 15	110 ± 8	113 ± 15	113 ± 5
	4	24h	97 ± 33	100 ± 4	113 ± 16	116 ± 10	121 ± 14	112 ± 9	112 ± 7
	4	48h	113 ± 47	100 ± 6	124 ± 13	120 ± 10	117 ± 9	121 ± 15	116 ± 16
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpDmsa	6	6h	95 ± 16	100 ± 7	103 ± 14	107 ± 11	110 ± 5	84 ± 6 <sup>D*/G-H*</sup>	56 ± 9 <sup>D***G-H***</sup>
	6	24h	93 ± 27	100 ± 15	91 ± 13	107 ± 14	98 ± 13	57 ± 11 <sup>D***G-H**</sup>	27 ± 8 <sup>D***G-H***</sup>
	6	48h	124 ± 5 <sup>t***</sup>	100 ± 7	123 ± 7	123 ± 14	108 ± 17	59 ± 3 <sup>D***G-H**</sup>	23 ± 4 <sup>D***G-H***</sup>
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - TdDmsa	6	6h	95 ± 16	100 ± 7	102 ± 8	102 ± 8	102 ± 10	113 ± 7	121 ± 12
	6	24h	93 ± 27	100 ± 15	110 ± 15	101 ± 5	104 ± 10	100 ± 14	100 ± 12
	6	48h	124 ± 5 <sup>t***</sup>	100 ± 7	123 ± 7	114 ± 9	112 ± 5	105 ± 7	82 ± 5 <sup>D**G-H**</sup>
Dmsa	4	6h	97 ± 18	100 ± 8	99 ± 13	106 ± 11	109 ± 15	116 ± 9	100 ± 5
	4	24h	94 ± 33	100 ± 17	92 ± 17	93 ± 8	100 ± 7	85 ± 3	82 ± 13
	4	48h	128 ± 5 <sup>t**</sup>	100 ± 7	110 ± 11	114 ± 13	105 ± 8	79 ± 2 <sup>D*/G-H*</sup>	64 ± 16 <sup>D**</sup>

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp) ou com cobertura de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa); e (ii) decomposição térmica, com cobertura de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa). **Cit**: citrato. **Dmsa**: ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **N**: número de casos em cada grupo. **C<sup>M</sup>**: grupo controle meio (meio de cultura - LHC 9). **C<sup>0</sup>**: grupo controle negativo (LHC 9 + solução de albumina sérica bovina). **t**: estatisticamente significativo no teste t de Student. **D**: estatisticamente significativo no Teste de Dunnett. **G-H**: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. **Significância**: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Quadro 4.** Dados brutos do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação.

		MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpCit			MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - CpDmsa			MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> - Cp		
GRUPO	POÇO	6h	24h	48h	6h	24h	48h	6h	24h	48h
1. (C <sup>M</sup> )	I.1 <sub>A</sub>	83,51	81,47	22,88	83,23	79,90	117,56	149,75	135,98	100,09
	I.1 <sub>B</sub>	89,08	123,98	140,47	117,62	64,64	126,34	101,74	110,81	121,70
	I.1 <sub>C</sub>	43,97	103,27	41,38	77,80	81,80	119,57	92,90	108,31	89,05
	II.1 <sub>A</sub>	102,80	103,80	131,38	98,65	144,19	121,42	107,02	132,29	96,77
	II.1 <sub>B</sub>	135,85	48,03	136,49	84,67	94,95	131,74	85,30	135,72	114,81
	II.1 <sub>C</sub>	105,76	90,12	124,06	113,88	93,29	129,58	108,32	115,10	109,92
2. (C <sup>0</sup> )	I.2 <sub>A</sub>	102,61	92,87	99,25	105,90	84,95	105,98	112,79	79,11	107,20
	I.2 <sub>B</sub>	80,59	102,44	90,59	97,78	89,95	88,26	86,41	82,54	96,31
	I.2 <sub>C</sub>	111,74	94,47	104,20	88,18	122,90	96,68	119,42	124,59	97,44
	II.2 <sub>A</sub>	76,51	94,05	96,77	94,52	85,65	96,70	88,19	97,08	94,61
	II.2 <sub>B</sub>	98,63	97,92	105,31	108,45	109,49	106,13	101,02	103,55	95,23
	II.2 <sub>C</sub>	129,91	118,25	103,88	105,18	107,07	106,26	92,18	113,12	109,22
3. (25,6 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.3 <sub>A</sub>	104,60	171,24	35,98	124,73	98,75	126,84	125,58	171,35	123,64
	I.3 <sub>B</sub>	92,78	101,64	113,34	92,50	96,08	115,89	127,69	123,42	101,35
	I.3 <sub>C</sub>	101,45	131,18	143,13	119,59	87,43	132,02	115,34	140,17	121,62
	II.3 <sub>A</sub>	86,90	105,51	109,47	92,31	83,17	114,19	123,80	144,75	127,64
	II.3 <sub>B</sub>	114,01	136,27	131,86	98,74	111,11	129,17	102,07	115,73	104,82
	II.3 <sub>C</sub>	97,65	85,22	119,79	92,64	71,81	120,91	119,95	146,70	112,38
4. (51,2 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.4 <sub>A</sub>	116,19	127,52	130,21	114,74	133,11	108,14	134,95	144,38	112,64
	I.4 <sub>B</sub>	101,64	99,43	110,59	103,88	95,77	119,33	118,51	132,73	100,62
	I.4 <sub>C</sub>	116,33	124,57	131,42	121,32	108,07	133,32	123,70	144,62	111,12
	II.4 <sub>A</sub>	95,01	108,00	108,45	88,56	92,18	115,14	125,29	120,20	111,19
	II.4 <sub>B</sub>	105,35	103,83	132,52	108,54	113,43	147,11	134,03	136,27	103,23
	II.4 <sub>C</sub>	93,90	111,51	119,71	110,56	104,46	116,19	118,61	129,17	115,77
5. (102,4 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.5 <sub>A</sub>	118,00	125,90	134,00	105,80	104,30	122,61	132,01	140,17	108,71
	I.5 <sub>B</sub>	114,71	105,63	112,42	115,94	94,60	80,11	142,64	123,53	103,06
	I.5 <sub>C</sub>	126,39	150,06	129,64	109,46	89,43	119,37	132,35	145,61	108,20
	II.5 <sub>A</sub>	126,25	106,25	109,24	106,43	82,65	96,77	137,35	111,88	112,93
	II.5 <sub>B</sub>	111,93	133,99	126,73	117,62	100,42	123,79	137,01	113,41	105,72
	II.5 <sub>C</sub>	108,59	127,20	122,50	107,15	120,12	105,83	131,53	136,58	107,60
6. (179,2 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.6 <sub>A</sub>	125,65	130,98	127,12	87,36	75,29	58,06	133,36	127,90	104,10
	I.6 <sub>B</sub>	105,02	121,79	103,74	82,03	44,56	53,58	128,22	115,00	98,75
	I.6 <sub>C</sub>	135,52	66,08	122,48	89,76	46,06	61,67	131,25	148,15	110,26
	II.6 <sub>A</sub>	123,84	110,33	105,32	76,07	53,61	62,39	134,80	120,67	103,64
	II.6 <sub>B</sub>	117,17	114,55	118,23	80,39	64,18	58,85	148,69	134,58	100,92
	II.6 <sub>C</sub>	106,04	104,69	113,82	93,27	60,30	62,07	131,87	123,71	104,78
7. (256 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.7 <sub>A</sub>	120,41	118,42	122,21	45,90	15,98	24,47	132,01	123,79	104,80
	I.7 <sub>B</sub>	112,95	103,83	105,04	62,57	36,40	14,39	138,55	118,92	92,83
	I.7 <sub>C</sub>	130,15	159,10	124,22	73,24	29,94	24,21	151,43	140,25	107,38
	II.7 <sub>A</sub>	110,12	109,97	99,74	48,45	19,93	28,69	130,28	100,88	95,58
	II.7 <sub>B</sub>	130,89	137,12	114,75	55,27	34,80	26,91	137,54	121,91	90,33
	II.7 <sub>C</sub>	112,90	129,74	104,04	55,37	25,77	24,53	130,43	120,38	96,87

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por coprecipitação, sem cobertura (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp) ou com coberta de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa). C<sup>M</sup>: grupo controle meio (LHC 9); C<sup>0</sup>: grupo controle negativo (LHC 9 + solução de albumina sérica bovina).

**Quadro 5.** Dados brutos do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição térmica.

		<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - TdCit</b>			<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - TdDmsa</b>		
<b>GRUPO</b>	<b>POÇO</b>	<b>6h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>6h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>
1. (C <sup>M</sup> )	I.1 <sub>A</sub>	83,51	81,47	22,88	83,23	79,90	117,56
	I.1 <sub>B</sub>	89,08	123,98	140,47	117,62	64,64	126,34
	I.1 <sub>C</sub>	43,97	103,27	41,38	77,80	81,80	119,57
	II.1 <sub>A</sub>	102,80	103,80	131,38	98,65	144,19	121,42
	II.1 <sub>B</sub>	135,85	48,03	136,49	84,67	94,95	131,74
	II.1 <sub>C</sub>	105,76	90,12	124,06	113,88	93,29	129,58
2. (C <sup>0</sup> )	I.2 <sub>A</sub>	102,61	92,87	99,25	105,90	84,95	105,98
	I.2 <sub>B</sub>	80,59	102,44	90,59	97,78	89,95	88,26
	I.2 <sub>C</sub>	111,74	94,47	104,20	88,18	122,90	96,68
	II.2 <sub>A</sub>	76,51	94,05	96,77	94,52	85,65	96,70
	II.2 <sub>B</sub>	98,63	97,92	105,31	108,45	109,49	106,13
	II.2 <sub>C</sub>	129,91	118,25	103,88	105,18	107,07	106,26
3. (25,6 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.3 <sub>A</sub>	119,35	114,02	127,76	116,57	108,42	121,02
	I.3 <sub>B</sub>	96,35	99,90	113,73	92,69	89,07	118,04
	I.3 <sub>C</sub>	97,05	96,39	131,54	107,68	112,49	137,20
	II.3 <sub>A</sub>	92,88	97,60	111,21	99,13	102,02	120,74
	II.3 <sub>B</sub>	109,89	104,69	133,87	105,47	133,59	124,38
	II.3 <sub>C</sub>	88,10	103,77	110,71	95,81	120,14	119,67
4. (51,2 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.4 <sub>A</sub>	101,87	114,38	139,03	114,84	106,42	116,28
	I.4 <sub>B</sub>	99,41	97,33	106,41	98,55	97,54	117,41
	I.4 <sub>C</sub>	92,60	136,89	114,03	109,79	99,83	114,38
	II.4 <sub>A</sub>	92,74	109,80	111,42	90,29	94,33	98,58
	II.4 <sub>B</sub>	103,35	112,54	126,05	104,32	108,11	129,10
	II.4 <sub>C</sub>	99,18	113,64	113,00	99,70	101,06	113,93
5. (102,4 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.5 <sub>A</sub>	94,64	107,73	106,96	105,76	96,66	109,09
	I.5 <sub>B</sub>	90,61	100,61	112,06	93,89	100,94	108,05
	I.5 <sub>C</sub>	115,08	104,60	110,23	109,36	110,30	118,91
	II.5 <sub>A</sub>	81,06	89,71	109,80	84,96	94,77	109,25
	II.5 <sub>B</sub>	103,68	54,26	123,67	113,11	122,92	119,08
	II.5 <sub>C</sub>	128,52	110,36	111,99	106,53	103,04	107,85
6. (179,2 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.6 <sub>A</sub>	109,98	78,34	83,89	124,49	104,63	102,63
	I.6 <sub>B</sub>	99,27	81,65	87,09	105,18	80,02	104,52
	I.6 <sub>C</sub>	109,75	90,45	79,25	104,75	85,61	112,60
	II.6 <sub>A</sub>	125,19	76,42	90,75	115,32	104,73	92,02
	II.6 <sub>B</sub>	92,60	85,10	75,28	115,75	108,40	114,04
	II.6 <sub>C</sub>	106,74	83,01	85,06	114,84	118,54	106,89
7. (256 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.7 <sub>A</sub>	116,19	45,34	23,77	127,90	83,51	84,03
	I.7 <sub>B</sub>	111,00	49,18	24,92	121,61	98,67	77,31
	I.7 <sub>C</sub>	105,81	51,78	23,43	117,96	112,22	75,69
	II.7 <sub>A</sub>	102,70	40,88	28,37	111,91	93,56	79,70
	II.7 <sub>B</sub>	123,24	50,84	28,78	106,38	101,40	89,65
	II.7 <sub>C</sub>	119,21	65,40	32,62	141,78	116,54	87,80

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por decomposição térmica, com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). C<sup>M</sup>: grupo controle meio (LHC 9); C<sup>0</sup>: grupo controle negativo (LHC 9 + solução de albumina sérica bovina).

**Quadro 6.** Dados brutos do ensaio de viabilidade celular por quantificação luminométrica do trifosfato de adenosina em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com coberturas.

GRUPO	POÇO	CIT			DMSA		
		6h	24h	48h	6h	24h	48h
1. (C <sup>M</sup> )	I.1 <sub>A</sub>	96,96	127,52	141,58	120,97	63,37	130,33
	I.1 <sub>B</sub>	47,87	106,22	41,71	80,02	80,20	123,35
	II.1 <sub>A</sub>	111,90	106,77	132,42	101,46	141,36	125,26
	II.1 <sub>B</sub>	147,87	49,40	137,56	87,08	93,10	135,90
2. (C <sup>0</sup> )	I.2 <sub>A</sub>	87,73	105,37	91,30	100,57	88,19	91,05
	I.2 <sub>B</sub>	121,63	97,17	105,03	90,69	120,49	99,73
	II.2 <sub>A</sub>	83,29	96,74	97,54	97,21	83,98	99,75
	II.2 <sub>B</sub>	107,35	100,72	106,14	111,54	107,34	109,48
3. (25,6 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.3 <sub>A</sub>	122,04	111,90	139,37	100,07	98,06	118,22
	I.3 <sub>B</sub>	89,34	91,61	105,74	82,59	67,87	103,32
	II.3 <sub>A</sub>	117,60	128,83	125,45	115,19	108,92	121,88
	II.3 <sub>B</sub>	123,30	120,96	126,11	98,15	96,10	98,66
4. (51,2 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.4 <sub>A</sub>	99,03	118,16	131,11	110,70	98,45	133,82
	I.4 <sub>B</sub>	90,91	106,95	110,08	89,21	82,77	101,96
	II.4 <sub>A</sub>	124,36	130,83	129,36	111,44	101,93	110,93
	II.4 <sub>B</sub>	119,16	111,14	112,69	113,07	92,24	110,15
5. (102,4 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.5 <sub>A</sub>	114,52	125,67	131,11	119,10	101,29	116,48
	I.5 <sub>B</sub>	100,14	113,48	112,43	87,92	93,79	94,56
	II.5 <sub>A</sub>	108,87	139,34	115,17	123,49	109,63	105,26
	II.5 <sub>B</sub>	118,96	107,50	112,16	107,19	96,18	107,06
6. (179,2 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.6 <sub>A</sub>	107,86	115,91	144,39	114,06	87,62	77,06
	I.6 <sub>B</sub>	135,56	112,91	111,92	103,78	87,66	78,19
	II.6 <sub>A</sub>	101,05	122,48	113,63	127,05	84,51	83,19
	II.6 <sub>B</sub>	111,44	99,57	115,49	120,23	80,24	80,02
7. (256 mg.mL <sup>-1</sup> )	I.7 <sub>A</sub>	110,84	117,13	137,99	107,68	87,74	86,72
	I.7 <sub>B</sub>	115,68	103,55	119,39	99,28	66,74	47,49
	II.7 <sub>A</sub>	119,67	120,32	104,26	95,73	98,96	65,92
	II.7 <sub>B</sub>	107,76	110,41	103,43	98,84	77,99	57,39

**Cit:** Citrato. **Dmsa:** ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **C<sup>M</sup>:** grupo controle meio (LHC 9); **C<sup>0</sup>:** grupo controle negativo (LHC 9 + solução de albumina sérica bovina).

## 9.2. Síntese dos resultados e dados brutos

### Ensaio de eletroforese alcalina em gel de células individuais (Cometa)

**Quadro 7.** Síntese dos resultados do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês.

Item	N	Tempo	Intensidade da Cauda (% de DNA)								
			C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup> (0 mg.mL <sup>-1</sup> )	12,8 mg.mL <sup>-1</sup>	25,6 mg.mL <sup>-1</sup>	51,2 mg.mL <sup>-1</sup>	102,4 mg.mL <sup>-1</sup>	153,6 mg.mL <sup>-1</sup>	204,8 mg.mL <sup>-1</sup>	256 mg.mL <sup>-1</sup>
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - Cp</b>	4	6h	61 ± 12 <sup>t***</sup>	5 ± 0	-	5 ± 0	7 ± 0	8 ± 4	-	7 ± 2	12 ± 4 <sup>D*</sup>
	4	24h	69 ± 3 <sup>t***</sup>	5 ± 0	-	7 ± 2	7 ± 2	8 ± 1 <sup>D*/G-H*</sup>	-	7 ± 2	7 ± 1
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - CpCit</b>	4	6h	68 ± 7 <sup>t***</sup>	6 ± 1	-	5 ± 0	6 ± 0	6 ± 1	-	6 ± 0	6 ± 1
	4	24h	69 ± 0 <sup>t***</sup>	9 ± 5	-	7 ± 1	6 ± 1	9 ± 4	-	6 ± 1	7 ± 1
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - TdCit</b>	4	6h	68 ± 7 <sup>t***</sup>	6 ± 1	-	7 ± 1	5 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	5 ± 0	-
	4	24h	69 ± 0 <sup>t***</sup>	9 ± 5	-	8 ± 1	8 ± 2	8 ± 1	6 ± 0	8 ± 1	-
<b>Cit</b>	4	6h	64 ± 5 <sup>t***</sup>	5 ± 0	4 ± 0	-	6 ± 2	5 ± 0	-	-	-
	4	24h	62 ± 8 <sup>t**</sup>	5 ± 0	5 ± 1	-	5 ± 0	5 ± 0	-	-	-
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - CpDmsa</b>	4	6h	56 ± 11 <sup>t***</sup>	6 ± 1	-	7 ± 0	6 ± 1	7 ± 1	8 ± 0	8 ± 2	-
	4	24h	64 ± 4 <sup>t***</sup>	5 ± 1	-	7 ± 2	7 ± 2	7 ± 2	6 ± 1	8 ± 3	-
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - TdDmsa</b>	4	6h	56 ± 11 <sup>t***</sup>	6 ± 1	-	7 ± 0	6 ± 0	6 ± 1	-	10 ± 2 <sup>D*</sup>	8 ± 2
	4	24h	64 ± 4 <sup>t***</sup>	5 ± 1	-	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 2	-	7 ± 2	9 ± 4
<b>Dmsa</b>	4	6h	64 ± 5 <sup>t***</sup>	5 ± 0	7 ± 6	-	5 ± 1	5 ± 0	-	-	-
	4	24h	62 ± 8 <sup>t**</sup>	5 ± 0	5 ± 0	-	5 ± 0	6 ± 1	-	-	-

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp**) ou com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa**); e (ii) decomposição térmica, com cobertura de citrato (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit**) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (**MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa**). **Cit**: citrato. **Dmsa**: ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **N**: número de casos em cada grupo. **C<sup>+</sup>**: grupo controle positivo (LHC 9 + solução de peróxido de hidrogênio). **C<sup>-</sup>**: grupo controle negativo (LHC 9 + solução de albumina sérica bovina). **t**: estatisticamente significativo no teste t de Student. **D**: estatisticamente significativo no Teste de Dunnett. **G-H**: estatisticamente significativo no teste de Games-Howell. **Significância**: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Quadro 8.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e sem cobertura ( $MnFe_2O_4$ -Cp).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	73,10	74,93	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	71,88	73,47
I.1 <sub>A2</sub>	70,65	72,00				
I.1 <sub>B1</sub>	73,14	71,84	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	72,80	71,17
I.1 <sub>B2</sub>	72,45	70,49				
II.1 <sub>A1</sub>	53,44	68,96	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	50,77	69,71
II.1 <sub>A2</sub>	48,09	70,46				
II.1 <sub>B1</sub>	52,92	69,18	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	50,32	64,86
II.1 <sub>B2</sub>	47,71	60,53				
I.2 <sub>A1</sub>	6,45	4,20	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,73	4,55
I.2 <sub>A2</sub>	5,01	4,90				
I.2 <sub>B1</sub>	5,43	4,99	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,13	4,82
I.2 <sub>B2</sub>	4,83	4,65				
II.2 <sub>A1</sub>	5,97	6,66	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,46	5,85
II.2 <sub>A2</sub>	6,95	5,03				
II.2 <sub>B1</sub>	5,79	5,80	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,88	5,47
II.2 <sub>B2</sub>	5,97	5,14				
I.3 <sub>A1</sub>	4,86	6,71	I.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	5,86	6,06
I.3 <sub>A2</sub>	6,85	5,41				
I.3 <sub>B1</sub>	7,43	5,03	I.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	5,99	5,49
I.3 <sub>B2</sub>	4,55	5,94				
II.3 <sub>A1</sub>	5,79	6,58	II.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	6,02	6,77
II.3 <sub>A2</sub>	6,24	6,95				
II.3 <sub>B1</sub>	5,27	13,48	II.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	5,59	10,74
II.3 <sub>B2</sub>	5,90	7,99				
I.4 <sub>A1</sub>	7,41	6,09	I.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	7,45	5,52
I.4 <sub>A2</sub>	7,48	4,94				
I.4 <sub>B1</sub>	6,85	5,95	I.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,95	6,28
I.4 <sub>B2</sub>	7,04	6,60				
II.4 <sub>A1</sub>	7,28	9,10	II.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	8,20	8,21
II.4 <sub>A2</sub>	9,11	7,31				
II.4 <sub>B1</sub>	6,66	8,59	II.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,95	11,43
II.4 <sub>B2</sub>	7,24	14,27				
I.5 <sub>A1</sub>	7,47	8,31	I.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	8,32	8,25
I.5 <sub>A2</sub>	9,17	8,19				
I.5 <sub>B1</sub>	15,70	7,91	I.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	14,89	8,24
I.5 <sub>B2</sub>	14,07	8,56				
II.5 <sub>A1</sub>	5,61	7,75	II.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	5,82	8,49
II.5 <sub>A2</sub>	6,02	9,23				
II.5 <sub>B1</sub>	6,65	9,57	II.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	6,93	10,77
II.5 <sub>B2</sub>	7,20	11,97				
I.6 <sub>A1</sub>	11,03	6,48	I.6 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	10,32	5,80
I.6 <sub>A2</sub>	9,61	5,11				
I.6 <sub>B1</sub>	7,04	7,06	I.6 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,35	7,39
I.6 <sub>B2</sub>	7,65	7,71				
II.6 <sub>A1</sub>	4,48	10,99	II.6 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	4,87	10,34
II.6 <sub>A2</sub>	5,25	9,68				
II.6 <sub>B1</sub>	5,95	5,22	II.6 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	5,58	4,59
II.6 <sub>B2</sub>	5,21	3,95				
I.7 <sub>A1</sub>	8,81	6,02	I.7 <sub>A</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	8,37	6,57
I.7 <sub>A2</sub>	7,92	7,11				
I.7 <sub>B1</sub>	7,95	7,56	I.7 <sub>B</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	8,09	7,18
I.7 <sub>B2</sub>	8,23	6,79				
II.7 <sub>A1</sub>	15,69	6,24	II.7 <sub>A</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	15,82	6,11
II.7 <sub>A2</sub>	15,95	5,98				
II.7 <sub>B1</sub>	12,73	9,07	II.7 <sub>B</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	16,54	8,92
II.7 <sub>B2</sub>	20,35	8,77				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

**Quadro 9.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e cobertura de citrato ( $MnFe_2O_4$ -CpCit).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	74,65	72,08	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	73,78	70,47
I.1 <sub>A2</sub>	72,90	68,86				
I.1 <sub>B1</sub>	76,46	69,16	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	76,15	70,43
I.1 <sub>B2</sub>	75,84	71,69				
II.1 <sub>A1</sub>	71,95	68,04	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	64,97	68,71
II.1 <sub>A2</sub>	57,98	69,37				
II.1 <sub>B1</sub>	63,39	70,07	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	60,81	69,62
II.1 <sub>B2</sub>	58,23	69,16				
I.2 <sub>A1</sub>	5,86	6,08	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,87	5,75
I.2 <sub>A2</sub>	5,88	5,41				
I.2 <sub>B1</sub>	8,20	8,57	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	8,20	9,00
I.2 <sub>B2</sub>	8,20	9,43				
II.2 <sub>A1</sub>	5,20	6,75	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	7,05	6,40
II.2 <sub>A2</sub>	8,89	6,05				
II.2 <sub>B1</sub>	6,72	26,47	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,63	17,95
II.2 <sub>B2</sub>	4,54	9,42				
I.3 <sub>A1</sub>	5,59	8,72	I.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	5,62	8,01
I.3 <sub>A2</sub>	5,64	7,30				
I.3 <sub>B1</sub>	6,89	6,28	I.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	6,70	7,12
I.3 <sub>B2</sub>	6,51	7,95				
II.3 <sub>A1</sub>	4,92	5,76	II.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	5,55	5,76
II.3 <sub>A2</sub>	6,18	5,75				
II.3 <sub>B1</sub>	5,44	7,81	II.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	4,89	7,89
II.3 <sub>B2</sub>	4,33	7,97				
I.4 <sub>A1</sub>	7,17	7,59	I.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,99	7,30
I.4 <sub>A2</sub>	6,81	7,00				
I.4 <sub>B1</sub>	6,97	5,10	I.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,18	5,23
I.4 <sub>B2</sub>	5,38	5,35				
II.4 <sub>A1</sub>	5,94	6,57	II.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,07	6,41
II.4 <sub>A2</sub>	6,19	6,25				
II.4 <sub>B1</sub>	5,76	6,73	II.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	5,64	7,81
II.4 <sub>B2</sub>	5,52	8,89				
I.5 <sub>A1</sub>	7,98	6,62	I.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	7,72	6,81
I.5 <sub>A2</sub>	7,45	6,99				
I.5 <sub>B1</sub>	8,28	7,00	I.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	7,84	5,93
I.5 <sub>B2</sub>	7,39	4,85				
II.5 <sub>A1</sub>	4,89	8,64	II.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	5,02	9,22
II.5 <sub>A2</sub>	5,15	9,80				
II.5 <sub>B1</sub>	5,84	19,02	II.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	5,62	15,38
II.5 <sub>B2</sub>	5,39	11,74				
I.6 <sub>A1</sub>	7,48	4,61	I.6 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,18	4,94
I.6 <sub>A2</sub>	6,87	5,27				
I.6 <sub>B1</sub>	7,47	8,34	I.6 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,42	8,06
I.6 <sub>B2</sub>	7,36	7,77				
II.6 <sub>A1</sub>	6,20	7,29	II.6 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	6,06	7,41
II.6 <sub>A2</sub>	5,91	7,53				
II.6 <sub>B1</sub>	6,64	4,90	II.6 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	6,32	6,99
II.6 <sub>B2</sub>	5,99	9,08				
I.7 <sub>A1</sub>	7,52	8,43	I.7 <sub>A</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	7,88	9,07
I.7 <sub>A2</sub>	8,23	9,70				
I.7 <sub>B1</sub>	8,63	5,38	I.7 <sub>B</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	8,06	5,46
I.7 <sub>B2</sub>	7,48	5,54				
II.7 <sub>A1</sub>	5,31	8,20	II.7 <sub>A</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	5,23	8,35
II.7 <sub>A2</sub>	5,14	8,50				
II.7 <sub>B1</sub>	5,11	9,01	II.7 <sub>B</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	5,13	8,11
II.7 <sub>B2</sub>	5,15	7,20				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

**Quadro 10.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por coprecipitação e cobertura de Dmsa ( $MnFe_2O_4$ -CpDmsa).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	43,66	61,63	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	44,82	64,70
I.1 <sub>A2</sub>	45,97	67,76				
I.1 <sub>B1</sub>	50,16	71,38	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	48,16	70,72
I.1 <sub>B2</sub>	46,16	70,05				
II.1 <sub>A1</sub>	64,09	57,35	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	65,34	58,69
II.1 <sub>A2</sub>	66,59	60,03				
II.1 <sub>B1</sub>	67,90	60,23	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	67,92	64,97
II.1 <sub>B2</sub>	67,93	69,70				
I.2 <sub>A1</sub>	5,85	6,63	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,69	5,66
I.2 <sub>A2</sub>	7,52	4,68				
I.2 <sub>B1</sub>	6,83	9,86	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	8,57	7,91
I.2 <sub>B2</sub>	10,30	5,96				
II.2 <sub>A1</sub>	4,67	4,07	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,05	4,23
II.2 <sub>A2</sub>	5,43	4,39				
II.2 <sub>B1</sub>	6,68	5,49	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,03	4,94
II.2 <sub>B2</sub>	5,38	4,38				
I.3 <sub>A1</sub>	6,50	10,38	I.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,34	9,25
I.3 <sub>A2</sub>	8,17	8,12				
I.3 <sub>B1</sub>	8,07	9,09	I.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,11	8,89
I.3 <sub>B2</sub>	6,15	8,68				
II.3 <sub>A1</sub>	8,29	4,99	II.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,29	4,96
II.3 <sub>A2</sub>	6,28	4,93				
II.3 <sub>B1</sub>	6,01	4,57	II.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	6,36	5,18
II.3 <sub>B2</sub>	6,70	5,78				
I.4 <sub>A1</sub>	8,57	8,83	I.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	7,88	8,68
I.4 <sub>A2</sub>	7,19	8,52				
I.4 <sub>B1</sub>	8,79	12,42	I.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	7,99	10,55
I.4 <sub>B2</sub>	7,19	8,67				
II.4 <sub>A1</sub>	5,87	5,67	II.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	5,12	6,84
II.4 <sub>A2</sub>	4,37	8,00				
II.4 <sub>B1</sub>	6,67	5,54	II.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,63	5,89
II.4 <sub>B2</sub>	6,59	6,23				
I.5 <sub>A1</sub>	5,10	7,99	I.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	6,52	7,83
I.5 <sub>A2</sub>	7,93	7,67				
I.5 <sub>B1</sub>	9,59	9,12	I.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	9,63	9,76
I.5 <sub>B2</sub>	9,67	10,39				
II.5 <sub>A1</sub>	7,01	6,72	II.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	7,13	6,78
II.5 <sub>A2</sub>	7,25	6,84				
II.5 <sub>B1</sub>	8,45	5,44	II.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	8,34	4,90
II.5 <sub>B2</sub>	8,22	4,36				
I.6 <sub>A1</sub>	7,67	8,12	I.6 <sub>A</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,87	7,73
I.6 <sub>A2</sub>	8,06	7,34				
I.6 <sub>B1</sub>	10,30	8,46	I.6 <sub>B</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	8,85	9,09
I.6 <sub>B2</sub>	7,39	9,72				
II.6 <sub>A1</sub>	6,72	5,65	II.6 <sub>A</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,08	5,56
II.6 <sub>A2</sub>	7,44	5,46				
II.6 <sub>B1</sub>	9,02	5,92	II.6 <sub>B</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	8,84	5,15
II.6 <sub>B2</sub>	8,65	4,38				
I.7 <sub>A1</sub>	7,19	12,09	I.7 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	8,07	13,15
I.7 <sub>A2</sub>	8,94	14,21				
I.7 <sub>B1</sub>	12,90	7,68	I.7 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	11,09	9,30
I.7 <sub>B2</sub>	9,28	10,91				
II.7 <sub>A1</sub>	6,38	5,94	II.7 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	6,50	5,35
II.7 <sub>A2</sub>	6,62	4,75				
II.7 <sub>B1</sub>	7,05	4,85	II.7 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	6,96	5,21
II.7 <sub>B2</sub>	6,86	5,56				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

**Quadro 11.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição técnica e cobertura de citrato ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-TdCit}$ ).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	74,65	72,08	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	73,78	70,47
I.1 <sub>A2</sub>	72,90	68,86				
I.1 <sub>B1</sub>	76,46	69,16	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	76,15	70,43
I.1 <sub>B2</sub>	75,84	71,69				
II.1 <sub>A1</sub>	71,95	68,04	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	64,97	68,71
II.1 <sub>A2</sub>	57,98	69,37				
II.1 <sub>B1</sub>	63,39	70,07	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	60,81	69,62
II.1 <sub>B2</sub>	58,23	69,16				
I.2 <sub>A1</sub>	5,86	6,08	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,87	5,75
I.2 <sub>A2</sub>	5,88	5,41				
I.2 <sub>B1</sub>	8,20	8,57	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	8,20	9,00
I.2 <sub>B2</sub>	8,20	9,43				
II.2 <sub>A1</sub>	5,20	6,75	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	7,05	6,40
II.2 <sub>A2</sub>	8,89	6,05				
II.2 <sub>B1</sub>	6,72	26,47	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,63	17,95
II.2 <sub>B2</sub>	4,54	9,42				
I.3 <sub>A1</sub>	7,09	8,54	I.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,90	9,03
I.3 <sub>A2</sub>	8,71	9,52				
I.3 <sub>B1</sub>	5,05	5,69	I.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	5,50	6,39
I.3 <sub>B2</sub>	5,95	7,08				
II.3 <sub>A1</sub>	7,35	10,47	II.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,80	10,25
II.3 <sub>A2</sub>	8,24	10,02				
II.3 <sub>B1</sub>	5,65	6,97	II.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	8,25	6,90
II.3 <sub>B2</sub>	10,84	6,82				
I.4 <sub>A1</sub>	6,18	13,33	I.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,09	11,77
I.4 <sub>A2</sub>	5,99	10,21				
I.4 <sub>B1</sub>	5,27	8,75	I.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	5,21	8,57
I.4 <sub>B2</sub>	5,14	8,38				
II.4 <sub>A1</sub>	5,93	6,74	II.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,13	6,19
II.4 <sub>A2</sub>	6,32	5,64				
II.4 <sub>B1</sub>	4,90	7,49	II.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	5,17	6,89
II.4 <sub>B2</sub>	5,44	6,29				
I.5 <sub>A1</sub>	7,04	9,27	I.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	6,32	8,66
I.5 <sub>A2</sub>	5,59	8,05				
I.5 <sub>B1</sub>	6,32	11,45	I.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	6,12	10,78
I.5 <sub>B2</sub>	5,92	10,10				
II.5 <sub>A1</sub>	6,70	6,50	II.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	6,42	6,47
II.5 <sub>A2</sub>	6,14	6,44				
II.5 <sub>B1</sub>	4,47	7,76	II.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	5,80	7,34
II.5 <sub>B2</sub>	7,13	6,92				
I.6 <sub>A1</sub>	4,83	6,93	I.6 <sub>A</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	5,21	6,95
I.6 <sub>A2</sub>	5,58	6,96				
I.6 <sub>B1</sub>	5,41	7,74	I.6 <sub>B</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	6,07	6,80
I.6 <sub>B2</sub>	6,72	5,85				
II.6 <sub>A1</sub>	6,38	6,67	II.6 <sub>A</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,27	6,91
II.6 <sub>A2</sub>	8,15	7,14				
II.6 <sub>B1</sub>	7,08	6,36	II.6 <sub>B</sub> (153,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	6,89	7,05
II.6 <sub>B2</sub>	6,70	7,74				
I.7 <sub>A1</sub>	6,32	9,04	I.7 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	6,80	9,63
I.7 <sub>A2</sub>	7,28	10,22				
I.7 <sub>B1</sub>	5,43	7,77	I.7 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	5,58	9,17
I.7 <sub>B2</sub>	5,72	10,56				
II.7 <sub>A1</sub>	5,30	7,51	II.7 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	5,73	7,44
II.7 <sub>A2</sub>	6,15	7,36				
II.7 <sub>B1</sub>	5,21	10,11	II.7 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	5,59	7,92
II.7 <sub>B2</sub>	5,97	5,73				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

**Quadro 12.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês sintetizadas por decomposição técnica e cobertura de Dmsa ( $MnFe_2O_4$ -TdDmsa).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	43,66	61,63	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	44,82	64,70
I.1 <sub>A2</sub>	45,97	67,76				
I.1 <sub>B1</sub>	50,16	71,38	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	48,16	70,72
I.1 <sub>B2</sub>	46,16	70,05				
II.1 <sub>A1</sub>	64,09	57,35	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	65,34	58,69
II.1 <sub>A2</sub>	66,59	60,03				
II.1 <sub>B1</sub>	67,90	60,23	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	67,92	64,97
II.1 <sub>B2</sub>	67,93	69,70				
I.2 <sub>A1</sub>	5,85	6,63	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,69	5,66
I.2 <sub>A2</sub>	7,52	4,68				
I.2 <sub>B1</sub>	6,83	9,86	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	8,57	7,91
I.2 <sub>B2</sub>	10,30	5,96				
II.2 <sub>A1</sub>	4,67	4,07	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,05	4,23
II.2 <sub>A2</sub>	5,43	4,39				
II.2 <sub>B1</sub>	6,68	5,49	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,03	4,94
II.2 <sub>B2</sub>	5,38	4,38				
I.3 <sub>A1</sub>	8,75	8,29	I.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,47	7,74
I.3 <sub>A2</sub>	6,18	7,19				
I.3 <sub>B1</sub>	6,70	7,65	I.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,06	7,34
I.3 <sub>B2</sub>	7,41	7,03				
II.3 <sub>A1</sub>	6,54	5,14	II.3 <sub>A</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,08	5,25
II.3 <sub>A2</sub>	7,62	5,35				
II.3 <sub>B1</sub>	9,47	4,48	II.3 <sub>B</sub> (25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	3	7,64	4,65
II.3 <sub>B2</sub>	5,80	4,81				
I.4 <sub>A1</sub>	7,34	7,44	I.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,44	7,26
I.4 <sub>A2</sub>	5,53	7,07				
I.4 <sub>B1</sub>	6,14	5,29	I.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	7,63	5,97
I.4 <sub>B2</sub>	9,12	6,65				
II.4 <sub>A1</sub>	5,93	7,10	II.4 <sub>A</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	6,53	6,67
II.4 <sub>A2</sub>	7,13	6,23				
II.4 <sub>B1</sub>	5,87	5,25	II.4 <sub>B</sub> (51,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	4	5,76	4,69
II.4 <sub>B2</sub>	5,65	4,12				
I.5 <sub>A1</sub>	9,40	9,50	I.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	7,57	8,36
I.5 <sub>A2</sub>	5,74	7,22				
I.5 <sub>B1</sub>	5,13	11,98	I.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	5,62	11,64
I.5 <sub>B2</sub>	6,11	11,29				
II.5 <sub>A1</sub>	6,80	6,67	II.5 <sub>A</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	6,61	6,10
II.5 <sub>A2</sub>	6,42	5,53				
II.5 <sub>B1</sub>	7,77	5,39	II.5 <sub>B</sub> (102,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	5	8,08	5,64
II.5 <sub>B2</sub>	8,38	5,88				
I.6 <sub>A1</sub>	12,19	9,78	I.6 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	12,11	10,15
I.6 <sub>A2</sub>	12,02	10,52				
I.6 <sub>B1</sub>	10,79	7,12	I.6 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	12,74	9,15
I.6 <sub>B2</sub>	14,68	11,17				
II.6 <sub>A1</sub>	7,49	7,03	II.6 <sub>A</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	7,65	6,63
II.6 <sub>A2</sub>	7,80	6,23				
II.6 <sub>B1</sub>	8,92	6,31	II.6 <sub>B</sub> (204,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6	10,06	5,69
II.6 <sub>B2</sub>	11,19	5,07				
I.7 <sub>A1</sub>	14,32	11,92	I.7 <sub>A</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	12,40	10,75
I.7 <sub>A2</sub>	10,47	9,58				
I.7 <sub>B1</sub>	8,40	9,81	I.7 <sub>B</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	7,22	14,40
I.7 <sub>B2</sub>	6,04	18,99				
II.7 <sub>A1</sub>	7,22	6,14	II.7 <sub>A</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	6,48	7,08
II.7 <sub>A2</sub>	5,74	8,01				
II.7 <sub>B1</sub>	8,05	4,99	II.7 <sub>B</sub> (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7	8,44	5,37
II.7 <sub>B2</sub>	8,82	5,74				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

**Quadro 13.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com citrato (Cit).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	71,88	68,43	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	71,25	70,16
I.1 <sub>A2</sub>	70,61	71,89				
I.1 <sub>B1</sub>	65,91	70,35	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	67,64	69,40
I.1 <sub>B2</sub>	69,36	68,45				
II.1 <sub>A1</sub>	62,82	55,29	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	59,67	53,69
II.1 <sub>A2</sub>	56,51	52,08				
II.1 <sub>B1</sub>	57,61	55,43	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	59,84	56,54
II.1 <sub>B2</sub>	62,06	57,64				
I.2 <sub>A1</sub>	5,00	5,43	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,25	5,43
I.2 <sub>A2</sub>	5,50	5,42				
I.2 <sub>B1</sub>	6,58	6,68	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,78	6,39
I.2 <sub>B2</sub>	4,98	6,09				
II.2 <sub>A1</sub>	5,58	7,05	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,63	6,84
II.2 <sub>A2</sub>	5,68	6,62				
II.2 <sub>B1</sub>	6,43	5,26	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,37	4,95
II.2 <sub>B2</sub>	6,31	4,63				
I.3 <sub>A1</sub>	4,28	5,40	I.3 <sub>A</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	4,64	4,93
I.3 <sub>A2</sub>	4,99	4,46				
I.3 <sub>B1</sub>	4,22	7,47	I.3 <sub>B</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	4,53	7,66
I.3 <sub>B2</sub>	4,83	7,84				
II.3 <sub>A1</sub>	4,58	4,44	II.3 <sub>A</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	5,67	4,83
II.3 <sub>A2</sub>	6,75	5,22				
II.3 <sub>B1</sub>	4,85	5,13	II.3 <sub>B</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	4,88	4,89
II.3 <sub>B2</sub>	4,90	4,64				
I.4 <sub>A1</sub>	4,10	6,09	I.4 <sub>A</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	4,64	5,73
I.4 <sub>A2</sub>	5,18	5,37				
I.4 <sub>B1</sub>	4,97	4,74	I.4 <sub>B</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	4,63	5,35
I.4 <sub>B2</sub>	4,28	5,96				
II.4 <sub>A1</sub>	4,65	5,71	II.4 <sub>A</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	4,96	5,15
II.4 <sub>A2</sub>	5,26	4,59				
II.4 <sub>B1</sub>	10,10	5,14	II.4 <sub>B</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	9,86	5,00
II.4 <sub>B2</sub>	9,62	4,85				
I.5 <sub>A1</sub>	4,35	5,86	I.5 <sub>A</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	4,44	6,19
I.5 <sub>A2</sub>	4,52	6,52				
I.5 <sub>B1</sub>	5,42	5,03	I.5 <sub>B</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	5,54	5,54
I.5 <sub>B2</sub>	5,66	6,04				
II.5 <sub>A1</sub>	6,87	7,03	II.5 <sub>A</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	5,87	6,29
II.5 <sub>A2</sub>	4,86	5,54				
II.5 <sub>B1</sub>	5,31	5,44	II.5 <sub>B</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	6,18	5,42
II.5 <sub>B2</sub>	7,05	5,40				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

**Quadro 14.** Dados brutos do ensaio do cometa em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com ácido mês-2,3-dimercaptossuccínico (Dmsa).

LÂMINA ( $X_{50}$ )	6h	24h	POÇO ( $X_{100}$ )	GRUPO	6h	24h
I.1 <sub>A1</sub>	71,88	68,43	I.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	71,25	70,16
I.1 <sub>A2</sub>	70,61	71,89				
I.1 <sub>B1</sub>	65,91	70,35	I.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	67,64	69,40
I.1 <sub>B2</sub>	69,36	68,45				
II.1 <sub>A1</sub>	62,82	55,29	II.1 <sub>A</sub> (C <sup>+</sup> )	1	59,67	53,69
II.1 <sub>A2</sub>	56,51	52,08				
II.1 <sub>B1</sub>	57,61	55,43	II.1 <sub>B</sub> (C <sup>+</sup> )	1	59,84	56,54
II.1 <sub>B2</sub>	62,06	57,64				
I.2 <sub>A1</sub>	5,00	5,43	I.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,25	5,43
I.2 <sub>A2</sub>	5,50	5,42				
I.2 <sub>B1</sub>	6,58	6,68	I.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,78	6,39
I.2 <sub>B2</sub>	4,98	6,09				
II.2 <sub>A1</sub>	5,58	7,05	II.2 <sub>A</sub> (C <sup>-</sup> )	2	5,63	6,84
II.2 <sub>A2</sub>	5,68	6,62				
II.2 <sub>B1</sub>	6,43	5,26	II.2 <sub>B</sub> (C <sup>-</sup> )	2	6,37	4,95
II.2 <sub>B2</sub>	6,31	4,63				
I.3 <sub>A1</sub>	6,28	5,83	I.3 <sub>A</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	5,63	5,82
I.3 <sub>A2</sub>	4,97	5,80				
I.3 <sub>B1</sub>	4,26	5,95	I.3 <sub>B</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	4,00	5,26
I.3 <sub>B2</sub>	3,74	4,57				
II.3 <sub>A1</sub>	16,74	3,98	II.3 <sub>A</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	17,01	4,76
II.3 <sub>A2</sub>	17,27	5,53				
II.3 <sub>B1</sub>	5,37	4,90	II.3 <sub>B</sub> (12,8 µg.mL <sup>-1</sup> )	3	4,98	5,27
II.3 <sub>B2</sub>	4,59	5,64				
I.4 <sub>A1</sub>	3,75	5,63	I.4 <sub>A</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	4,53	4,91
I.4 <sub>A2</sub>	5,30	4,19				
I.4 <sub>B1</sub>	6,33	5,44	I.4 <sub>B</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	6,74	5,56
I.4 <sub>B2</sub>	7,14	5,67				
II.4 <sub>A1</sub>	3,88	4,92	II.4 <sub>A</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	3,96	5,22
II.4 <sub>A2</sub>	4,03	5,52				
II.4 <sub>B1</sub>	4,99	4,81	II.4 <sub>B</sub> (25,6 µg.mL <sup>-1</sup> )	4	5,84	5,01
II.4 <sub>B2</sub>	6,69	5,20				
I.5 <sub>A1</sub>	5,10	8,38	I.5 <sub>A</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	5,13	7,39
I.5 <sub>A2</sub>	5,15	6,39				
I.5 <sub>B1</sub>	4,53	7,31	I.5 <sub>B</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	5,05	7,57
I.5 <sub>B2</sub>	5,57	7,82				
II.5 <sub>A1</sub>	6,80	4,87	II.5 <sub>A</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	6,73	4,51
II.5 <sub>A2</sub>	6,65	4,14				
II.5 <sub>B1</sub>	4,61	5,79	II.5 <sub>B</sub> (102,4 µg.mL <sup>-1</sup> )	5	5,00	5,69
II.5 <sub>B2</sub>	5,39	5,58				

$X_{50}$  e  $X_{100}$ : média da intensidade (%DNA na cauda) de 50 e de 100 cometas, respectivamente.

### 9.3. Síntese dos resultados e dados brutos

#### Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

**Quadro 15.** Dados brutos do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese em monocultivos de linhagem celular de epitélio bronquial humano (BEAS-2B) tratados com nanopartículas de ferrita de manganês e coberturas.

Grupo	Ocorrência	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cp	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> CpCit	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> CpDmsa	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> TdCit	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> TdDmsa	Cit	Dmsa
C <sup>+</sup>	Presente	220	199	185	199	185	220	220
	Ausente	1780	1801	1815	1801	1815	1780	1780
C <sup>-</sup>	Presente	34	33	35	33	35	34	34
	Ausente	1966	1967	1965	1967	1965	1966	1966
12,8 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	-	-	-	-	-	37	31
	Ausente	-	-	-	-	-	1963	1969
25,6 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	36	38	32	36	33	-	-
	Ausente	1964	1962	1968	1964	1967	-	-
51,2 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	34	36	31	36	35	34	37
	Ausente	1966	1964	1969	1964	1965	1966	1963
76,8 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	-	-	-	-	-	-	-
	Ausente	-	-	-	-	-	-	-
102,4 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	38	40	35	34	33	35	32
	Ausente	1962	1960	1965	1966	1967	1965	1968
153,6 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	33	38	35	39	37	-	-
	Ausente	1967	1962	1965	1961	1963	-	-
179,2 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	38	33	34	35	30	-	-
	Ausente	1962	1967	1966	1965	1970	-	-
204,8 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	36	36	34	35	37	-	-
	Ausente	1964	1964	1966	1965	1963	-	-
256 µg.mL <sup>-1</sup>	Presente	33	37	33	31	35	-	-
	Ausente	1967	1963	1967	1969	1965	-	-

As nanopartículas de ferrita de manganês foram sintetizadas por: (i) coprecipitação, sem cobertura (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Cp) ou com cobertura de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CpDmsa); e (ii) decomposição térmica, com cobertura de citrato (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdCit) ou de ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TdDmsa). **Cit:** citrato. **Dmsa:** ácido meso-2,3-dimercaptossuccínico. **C<sup>+</sup>:** grupo controle positivo (mitomicina-C). **C<sup>-</sup>:** grupo controle negativo (LHC 9 + solução de albumina sérica bovina).