



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas
de óxido de níquel em células de fibroblastos e queratinócitos.**

FABIANA VIEIRA DA SILVA

Brasília – DF

2016

FABIANA VIEIRA DA SILVA

Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel em células de fibroblastos e queratinócitos.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia pela Universidade de Brasília - UnB.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza.

Brasília – DF

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

BIBLIOTECA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

VSI586 s

Vieira da Silva, Fabiana
Síntese, caracterização e avaliação da
citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel
em culturas de células de fibroblastos e
queratinócitos (linhagens NIH-3T3 e HaCat) / Fabiana
Vieira da Silva; orientador Marcella Lemos Brettas
Carneiro; co-orientador Aparecido Ribeiro de Souza.
-- Brasília, 2016.
83 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Nanociência e
Nanobiotecnologia) -- Universidade de Brasília,
2016.

1. nanopartículas. 2. óxido de níquel.
3. citotoxicidade. 4. risco ocupacional. 5.
mineração. I. Lemos Brettas Carneiro, Marcella,
orient. II. Ribeiro de Souza, Aparecido, co-orient.
III. Título.

Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel em cultura de células de fibroblastos e queratinócitos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Brasília- (DF), 12 de julho de 2016.

Prof^a. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Faculdade de Planaltina - UNB

Orientadora

Prof^a. Dra. Taís Augusto Pitta Garcia Cotta

Instituto de Química - UNB

(Membro Titular Externo)

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Instituto de Ciências Biológicas - UNB

(Membro Titular Interno)

Prof^a. Dra. Ana Luísa Miranda Vilela

Faculdades Integradas da União

Educacional do Planalto Central (Faciplac)

(Membro suplente)

Dedicatória

A minha amada Mãe

Minha melhor amiga, minha maior incentivadora, a pessoa que me fazia sonhar todos os dias, que partiu antes que esse momento tão esperado chegasse. Partiu deixando a saudade da risada mais gostosa, do abraço com cheirinho, do colinho mais acolhedor, estas coisas que só Mãe tem; um vazio as vezes desesperador, mas deixando também o maior exemplo de perseverança na busca do conhecimento e que, apesar da sua luta diária, soube transmitir toda sua sabedoria, dedicação incondicional que realimentam o amor que me tornou uma pessoa capaz de chegar até aqui, de concretizar o nosso sonho e de ter fé.... Amor Supremo.

“Você se fez presente em todos os momentos, firmes e trêmulos e, passo a passo, pude sentir a sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir.”

Vinícius de Moraes

Agradecimentos

Dou graças a Deus por ser a minha Força maior, o meu Refúgio, Socorro bem presente, a minha Fortaleza nas adversidades. “Eu sei ó Senhor, que não é do homem o seu Caminho; nem do homem que caminha o dirigir os seus passos”. Jeremias 10:23.

Agradeço a minha família: meus amados e honrados pais Deusdete e Maria Divina, meus primeiros e eternos mestres; meus queridos irmãos Juliana e Rogério, que não mediram esforços em me ajudar; as lindas e carinhosas sobrinhas Lavinya e Julia; a companheira e incentivadora tia Marolina e demais tios e primos que tiveram presente durante este período. Sem vocês, teria eu enxergado mais pedras que flores pelo caminho. Sei que, mesmo com todo o meu esforço, a probabilidade de não ter conseguido chegar seria muito maior. Mais do que agradecer por terem me guiado por suas opiniões e influenciado por suas idéias, tenho que agradecer pela paciência com que sempre lidaram com as minhas fraquezas e inseguranças. A minha mãe, agradecer também pelo encorajamento por sempre me incentivar e ensinar que não podemos desistir perante aos desafios, a fazer mais e melhor sempre, sendo o meu maior exemplo de honestidade e força. Obrigada mãezinha!

À Professora Doutora Marcella Lemos Brettas Carneiro, na qualidade de minha orientadora, por todo o conselho, entusiasmo contagiante, que soube mesclar a arte de ensinar com o dom da convivência, sendo paciente e compreensiva. Obrigada por todos os ensinamentos que partilhou comigo, as indicações, dicas e correções. Tudo isto foi e será base não só para a construção do pensamento que se concretiza nesse trabalho, mas também pela maturidade que adquiri e vou levar por toda a minha vida.

Depois, como não poderia deixar de ser, quero agradecer imensamente ao Professor Doutor Aparecido Ribeiro de Souza Nunes, que mais do que meu co-orientador, foi muitas vezes a voz da experiência e da sabedoria, que amenizou as dificuldades em minha caminhada, trouxe a palavra certa, fazendo-me enxergar que em Ciência nem tudo é perfeito, nem tudo ocorre como o esperado, e que me ajudou na busca de auxílios financeiros para a realização das minhas análises, disponibilizou seu laboratório de pesquisa e esteve sempre pronto a me ajudar quando precisei.

Agradeço também à colaboradora Professora Dra. Graziella Anselmo Joanitti e a sua aluna de mestrado Marina Sampaio por ter nos auxiliado na realização dos ensaios de citotoxicidade, auxílios estes que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

A todos do Laboratório de Nanotecnologia, ICB - UNB, do Laboratório de Síntese Inorgânica, IQ - UFG e em especial Débora Santos, Elis Regina, Janaína, Mara, Matheus Oliveira e Juliana Veiga, aos quais sou grata, não só por todo o conhecimento científico compartilhado, mas também pelas risadas, nos dias em que estações mudaram e nada mudou. A todos, muito obrigada.

Ao Professor Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez e a Maria Betânia Teixeira do Laboratório de Materiais e Combustíveis (Pesquisa) Instituto de Química - Universidade de Brasília, pelas análises B.E.T. realizadas.

Aos técnicos da Central analítica do Instituto de Química – Universidade de Federal de Goiás, pelas análises realizadas.

À Dra. Tatiane Oliveira dos Santos, Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução - LabMic, Instituto de Física – UFG, pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

À Dra. Isabel Cristina Rodrigues da Silva, pela ajuda nos tratamentos estatísticos dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, responsável pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, ao coordenador do curso Prof. Dr. Sebastiao William da Silva, e a todos os professores pelo compromisso com a ciência, dedicação e conhecimentos compartilhados.

À Prof^a. Dra. Ana Luísa Miranda Vilela, ao Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo e a À Prof^a. Dra. Taís Augusto Pitta Garcia Cotta, como membros da banca examinadora.

Ao senhor Raimundo Nonato Araújo, administrador da Colina - UNB, que sempre me atendeu quando solicitei agendamento nos apartamentos de trânsito, me permitindo permanecer em Brasília para cursar as disciplinas e realizar os experimentos.

À Universidade de Brasília (UNB), por ter me dado oportunidade para a realização deste trabalho e, conseqüentemente para a formação de mestre.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) pela colaboração, com a realização desse trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, pelo suporte financeiro que permitiu a realização desta pesquisa.

A estrada que andei não foi só a dos laboratórios, das Universidades, agradeço a todos os meus amigos, em especial àqueles que tinham também seus afazeres, mas que isso nunca foi impedimento para me estenderem a mão quando as forças me faltaram. Muito obrigada!

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

RESUMO

A nanotecnologia é uma ciência em expansão e dentre as suas aplicações, destaca-se o uso de nanopartículas (NPs) de óxido de níquel. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito citotóxico de diferentes suspensões de nanopartículas de óxido de níquel, frente a viabilidade de células de fibroblastos (linhagem NIH-3T3) e de queratinócitos (linhagem HaCat). Assim, neste trabalho, realizou-se a síntese, caracterização e preparação de suspensões de óxido de níquel por meio de três metodologias, utilizando-se diferentes precursores metálicos (NiCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Ni}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e/ou solventes (água ou etanol). As formulações produzidas foram denominadas respectivamente: NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc e foram caracterizadas por difratometria de raios - X (DRX), termogravimetria (TG), análise textural (B.E.T.), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). As suspensões foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e foi feito um estudo da estabilidade dessas, usando como parâmetros o potencial zeta, o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão (PDI) e o pH. O teor de níquel em suspensão foi quantificado por espectroscopia de absorção atômica (EAA). Por meio das análises de DR-X notou-se; respectivamente, que NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc apresentaram diâmetro médio de 13, 19 e 21 nm e, por meio da análise de B.E.T., verificou-se que a área superficial destas NPs foram de 33, 31 e 27 m^2/g respectivamente. Em relação à análise TG, verificou-se que a formação de óxido de níquel ocorreu acima de 385 °C para as três formulações investigadas. Também, foi notado que estas formulações apresentaram forma, predominantemente esférica e com tendência à aglomeração. Quanto a estabilidade observou-se que a formulação NiO-Et manteve - se estável em todos os parâmetros avaliados, enquanto que as demais formulações apresentaram estabilidade moderada. Ainda, o efeito citotóxico das três formulações foi avaliado pelo método do MTT e notou-se que todas as formulações induziram maior citotoxicidade com o aumento da dose e tempo de tratamento.

Palavras-chave: nanopartículas, óxido de níquel, risco ocupacional, citotoxicidade.

ABSTRACT

Nanotechnology is a science in expansion and among its applications, there is the use of nanoparticles (NPs) of nickel oxide. However, there are few studies on the toxicity of these types of NPs especially those involving occupational risk. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect of different suspensions of nickel oxide nanoparticles front viability of fibroblast cells (NIH-3T3 line) and keratinocytes (HaCaT line). In this work, we carried out the synthesis, characterization and preparation of nickel oxide slurries by using three methods where different metal precursor were used (NiCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ or $\text{Ni}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) and/or solvents (water or ethanol). The produced formulations were called: NiO-Cl, NiO-Et and NiO-OAc and were characterized by X-ray diffraction (XRD), thermogravimetry (TG), texture analysis (B.E.T.), transmission electron microscopy (TEM) and infrared spectroscopy (FTIR). The suspensions were characterized by light scattering (DLS) and was made a study of the stability of these parameters using as the zeta potential, the hydrodynamic diameter, the polydispersity index (PDI) and pH. The nickel content of the suspension was quantified by atomic absorption spectroscopy (AAS). Through DR-ray analyzes are noted, respectively, that NiO-Cl, NiO-Et and NiO-OAc had an average diameter of 13, 19 and 21 nm, and B.E.T. analysis, it was found that the surface area these NPs were 33, 31 and 27 m^2/g respectively. Regarding the TG analysis showed that the nickel oxide formation occurred above 385 °C for three formulations investigated. Also, it was noted that these formulations exhibited form predominantly spherical and prone to agglomeration. The stability was observed that the NiO-Et formulation maintained - stable in all parameters, while the other formulations showed moderate stability. Also, the cytotoxic effect of the three formulations was evaluated by the MTT method, and it was observed that all formulations induced higher cytotoxicity with increasing dose and duration of treatment. In most cases it was noticed greater cytotoxic effect at 72 h in the NIH-3T3 line.

Keywords: nanoparticles, nickel oxide, occupational risk, cytotoxicity

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Considerações sobre o níquel.....	01
1.2. Nanotecnologia e Nanotoxicologia.....	06
1.3. Preparação de nanopartículas.....	10
1.3.1. Estabilização coloidal de nanopartículas.....	11
1.4. Nanopartículas de óxido de níquel e suas peculiaridades.....	13
1.5. Técnicas de análise e caracterização de nanopartículas.....	15
1.6. Mecanismos de internalização de nanopartículas.....	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	
3.1. Geral	20
3.2. Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Desenho Experimental.....	21
4.2. Síntese - hidróxido de níquel Ni(OH) ₂ e nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs).....	22
4.2.1. Síntese de hidróxido de níquel (Ni(OH) ₂ Cl).....	22
4.2.2. Síntese hidróxido de níquel (Ni(OH) ₂ Et).....	23
4.2.3. Síntese de hidróxido de níquel (Ni(OH) ₂ -OAc).....	24
4.2.4. Calcinação de hidróxido de níquel para obtenção de NiO-NPs (Cl, Et e OAc).....	25
4.3. Preparação de suspensões aquosas de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) e caracterização.....	25
4.3.1. Avaliação de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e pontencial zeta (PZ) das suspensões de NiO-OAc, NiO-Et e NiO-Cl.....	25
4.3.2. Espectroscopia de Absorção Atômica.....	26
4.4. Caracterização física e química das nanopartículas de óxido de níquel	
4.4.1. Análise Termogravimétrica(TG).....	26
4.4.2. Caracterização por Difração de Raios- X (DRX).....	26

4.4.3. Análise de Área Superficial (B.E.T).....	27
4.4.4. Espectroscopia na Região Infravermelho.....	27
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	27
4.4.6. Análise composicional (EDS).....	28
4.5. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT	
4.5.1. Cultura de células.....	28
4.5.2. Tratamento das células	29
4.5.3. Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	29
4.6. Análise Estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Síntese.....	31
5.2. Caracterização física e química das nanopartículas de óxido de níquel	
5.2.1. Análise Termogravimétrica – TG/DTG.....	33
5.2.2. Caracterização por Difração de Raios-X.....	35
5.2.3. Análise textural das nanopartículas.....	37
5.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão e Energia Dispersiva de Raios-X.....	40
5.2.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.3. Estabilidade das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc.....	46
5.3.1. Espectroscopia de absorção atômica (EAA).....	48
5.4. Considerações gerais sobre a caracterização das formulações.....	49
5.5. Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel <i>in vitro</i> por ensaio colorimétrico do MTT.....	50
5.5.1. Avaliação da citotoxicidade sobre a linhagem HaCat.....	50
5.5.2. Avaliação da citotoxicidade sobre a linhagem NIH-3T3.....	53
5.5.3. Considerações gerais sobre citotoxicidade das formulações.....	60
6. CONCLUSÃO	64
7. PERSPECTIVAS	65
8. APÊNDICE	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Espectrometria de Absorção Atômica

Ads - Adsorção

B.E.T. - Brunauer-Emmett-Teller

BDDT - (Braunauer, Deming e Teller)

CFC - Cúbica de face centrada

Cu - Cobre

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Des - Desorção

DMSO - Dimetil-sufóxido.

DP - Desvio padrão

DRX - Difração de Raios-X

DTG - Diferencial da curva termogravimétrica

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com transformada Fourier

NIH-3T3 - Linhagem de célula de fibroblastos humano

HaCat - Linhagem de célula de queratinócitos de muirinos

IARC - Internacional Agency for Researchon Câncer

IUPAC - União Internacional de Química pura e Aplicada

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%

INCA - Instituto Nacional de Câncer

INCO - The International Nickel Company

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MTT - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

Ni - Níquel

Ni⁺² - Íon níquel

NiO-Cl - Óxido de níquel em que o cloreto de níquel (II) anidro é o precursor metálico

NiO-Et - Óxido de níquel em que o cloreto níquel (II) hexahidratado é o precursor metálico e o etanol foi utilizado como solvente

NiO-OAc - Óxido de níquel em que o acetato níquel (II) tetrahidratado foi utilizado como precursor metálico

Ni(OH)₂-Cl - Hidróxido de níquel, em que o cloreto de níquel (II) anidro é o precursor metálico.

Ni(OH)₂-Et - Hidróxido de níquel em que o cloreto de níquel (II) hexahidratado é o precursor metálico e o etanol foi utilizado como solvente

Ni(OH)₂-OAc - Hidróxido em que o acetato de níquel (II) tetrahidratado foi utilizado como precursor metálico

Nm - Nanômetro

NPs - Nanopartículas

NiO-NPs - Nanopartículas de óxido de níquel

P.A. - Para análise

PDI - *Polydispersity Index* (índice de polidispersividade)

PZ - Potencial Zeta

ERO - Espécies reativas de oxigênio

-SH - Radical Sulfidríla

SI - Sistema Internacional

SOFC - Células de combustível de óxido sólido

TG - Análise Termoanalítica

TiO₂ - Óxido de titânio

UFG - Universidade Federal de Goiás

UnB - Universidade de Brasília

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva dose resposta. Efeitos de metais no organismo em relação à sua concentração: (a) elementos essenciais e (b) elementos não essenciais. “Adaptado de Lima & Merçon (2011)”.....	03
Figura 2. Esquema representativo das dimensões de algumas substâncias e suas respectivas escalas. “Adatado de Toma (2004)”.....	06
Figura 3. Representação esquemática da reação de redução de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio. “Adatado de Cory <i>et al.</i> , (1991)”.....	10
Figura 4. Representação esquemática dos métodos de obtenção de nanopartículas conhecidos como <i>top down</i> e <i>botton-up</i> . “Adaptado de Thassu <i>et al.</i> , (2007)”.....	11
Figura 5: Mecanismo de estabilização de partículas em suspensões: (a) estabilização de partículas por carga e (b) estabilização por efeito estérico. “Adaptado de Couto <i>et al.</i> , (2007)”.....	12
Figura 6. Demonstração esquemática dos compostos e procedimento utilizados para síntese de NiO-NPs através do método de obtenção de hidróxido metálico com posterior decomposição térmica.....	14
Figura 7. Representação esquemática das principais vias de internalização de nanopartículas pelas células. “Adaptado de Zhao <i>et al.</i> , (2011)”.....	16
Figura 8. Esquema representativo do desenho experimental conduzido neste estudo Síntese de NiO-NPs; caracterização das NiO-NPs por DRX, MET, E1 B.E.T.,T.TG/DTG,FTIR); caracterização das suspensões de NiO-NPs utilizando parâmetros: PDI, DH, PZ pH e EAA; ensaio colorímetro de viabilidade celular: MTT.....	21
Figura 9. Aparelhagem utilizada na síntese de Ni(OH) ₂ -Cl.....	22
Figura 10. Fotografias representativas das etapas de síntese de NiO-Cl (óxido de níquel produzido a partir de cloreto de níquel (II), anidro). A) aquecimento da mistura reacional e adição de água; B) precipitação de hidróxido de níquel; C) hidróxido de níquel seco a 100°C e D) NiO-Cl calcinado a 410 °C.....	31
Figura 11. Fotografias representativas das etapas realizadas na síntese NiO-Et (óxido de níquel produzido a partir de cloreto de níquel (II) hexahidratado em etanol). A) mistura reacional de cloreto de níquel hexahidratado (II), hidróxido de sódio e etanol; B) hidróxido de níquel seco a 100 °C e C) NiO-Et calcinado a 410 °C.	32
Figura 12. Fotografias representativas das etapas realizadas na síntese NiO-OAc (óxido de níquel produzido a partir de acetato de níquel (II) tetra hidratado). A) mistura reacional de acetato de níquel (II) tetra hidratado e hidróxido de sódio; B) hidróxido de níquel seco a 100 °C e C) NiO-OAc calcinado a 410 °C.....	32
Figura 13. Curvas termogravimétricas (TG -----) e suas derivadas (DTG -----) de hidróxido de níquel. A) Ni(OH) ₂ -Cl; B) Ni(OH) ₂ -Et e C) Ni(OH) ₂ -OAc obtidas em	35

atmosfera de N₂

Figura 14. Difratoogramas de nanopartículas de NiO calcinado a 410°C para nanopartículas das sínteses. A) NiO-Cl; B) NiO-Et e C) NiO-OAc..... **36**

iv

Figura 15. Isotermas de adsorção e dessorção de nanopartículas de óxido de níquel. A) NiO-Cl; B) NiO-Cl e C) NiO-OAc. **Des:** Dessorção; **Ads:** Adsorção..... **38**

Figura 16. Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-Cl) por microscopia eletrônica de transmissão no aumento de 200 kV. A) Micrografia eletrônica trnasmissão de nanopartículas de NiO-Cl; B) Histograma de NiO-Cl; C) Espectro de EDS e D) Posição e identificação do ponto analisado por EDS..... **42**

Figura 17. Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-Et) por microscopia eletrônica de transmissão no aumento de 200 kV. (A) Micrografia eletrônica trnasmissão de nanopartículas de NiO-Et; B) Histograma de NiO-Et; C) Espectro de EDS e D) Posição e identificação do ponto analisado por EDS..... **43**

Figura 18. Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-OAc) por microscopia eletrônica de transmissão no aumento de 200 kV. A) micrografia eletrônica trnasmissão de nanopartículas de NiO-OAc; B) Histograma de NiO-OAc; C) Espectro de EDS e D) Posição e identificação do ponto analisado por EDS..... **44**

Figura 19. Espectro de infravermelho para nanopartículas de óxido de níquel de sínteses distintas A) NiO-Cl; B) NiO-Et e C) NiO-OAc) na região de 400 a 4000 cm⁻¹..... **45**

Figura 20. Suspensões de nanopartículas de óxido de níquel dispersas em água ultrapura. A) NiO-Cl ; B) NiO-Et e C) NiO-OAc..... **46**

Figura 21. Parâmetros utilizados para o estudo de estabilidade das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc. (A) DH; (B) PDI; (C) PZ; e (D) pH..... **48**

Figura 22. Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc na linhagem celular HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e controle negativo. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas..... **51**

Figura 23. Distribuição da viabilidade celular segundoa concentração de nanoaprtículas de NiO-Cl em linhagem celular HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001..... **52**

Figura 24. Distribuição da viabilidade celular segundoa concentração de nanoaprtículas de NiO-Et em linhagem celular HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001..... **52**

- Figura 25.** Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-OAc em linhagem celular HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001..... 53
- Figura 26.** Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc na linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo e Médias ± DP de três triplicatas..... 54
- Figura 27.** Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Cl em linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001..... 55
- Figura 28.** Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Et em linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001..... 56
- Figura 29.** Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-OAc em linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com o H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001..... 57
- Figura 30.** Distribuição da média (delta - Δ) das diferenças entre os valores de viabilidade celular no período final de 72 h e valores de viabilidade celular no período inicial de 24 h para as formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc em linhagens celular HaCat e NIH-3T3. As células foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área de superfície específica, volume de poros e diâmetros de poros de nanopartículas de NiO calcinadas a 410 °C.....	39
Tabela 2. Diâmetro Hidrodinâmico médio (DH nm), Índice de Polidispersão (PDI), Potencial Zeta (mV) e pH das NiO-NPs.....	47
Tabela 3. Valores de diâmetro hidrodinâmico de distribuição de números de partículas obtidos por Espalhamento de Dinâmico Luz, diâmetro modal obtido por Microscopia Eletrônica de Transmissão, e diâmetro de cristalitos por meio de Difração de Raios-X para as três formulações das nanopartículas de óxido de níquel utilizadas neste trabalho.....	49
Tabela 4. Valores IC ₅₀ (valor da concentração de um composto necessária para reduzir pela metade a viabilidade celular).....	59
Tabela 5. Propriedades físico-químicas das nanopartículas.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre o Níquel

Desde 2000 a.C os chineses aplicavam ligas naturais de níquel-cobre na manufatura dos seus utensílios. Contudo, o níquel só foi conhecido como elemento químico em 1751, pelo químico e metalúrgico suíço Baron Axel Frederik Cronstedt, quando este pretendia extrair o cobre de um mineral chamado niquelite. Porém, ao invés de ele obter cobre como esperava, obteve um metal de cor branca que chamou de níquel, nome oriundo do mineral de onde fora extraído (SIGEL *et al.*, 2007).

O níquel é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre e representa o vigésimo quarto elemento mais abundante. O minério de níquel encontra-se geralmente associado aos sulfetos de ferro e cobre, próximo a reservatórios de silicatos e óxidos/hidróxidos. O níquel, quando está em sua forma metálica, pode ser identificado em meteoros junto com o ferro quando combinado com outros elementos, pode ser encontrado em diversos minerais como garnierita, milerita, pentlandita e pirrotina. Em relação ao estado de oxidação, o níquel é mais encontrado na forma +2 (WHO, 1991).

Aproximadamente 40% do metal de níquel produzido é utilizado na produção de aço, sendo também utilizado na fabricação de outras ligas. No processo de eletrodeposição ou galvânico são consumidos 20% do níquel produzido, principalmente na forma de sulfato e cloreto de níquel. Nas baterias de níquel-cádmio ele apresenta-se na forma de hidróxido de níquel. Já na indústria microeletrônica, a utilização do níquel está em plena expansão e representa um mercado promissor, especialmente em relação a proteção de metais leves, como alumínio e magnésio, utilizados em conectores de telefones celulares (WHO, 1991)

Sobretudo, assim como outros metais, o níquel pode representar um risco à saúde humana devido à sua capacidade cancerígena, ou seja, de

induzir câncer. Estudos prévios têm demonstrado a potencial toxicidade deste metal (VALLS & LORENZO, 2002).

Os metais, de uma forma geral, exibem maior toxicidade na forma de cátion ou combinado a cadeias carbônicas. Nos organismos, o principal mecanismo de ação tóxica decorre de sua afinidade química ao enxofre. Quando presentes em suas formas catiônicas, os metais reagem com o radical sulfridril (S-H) presente na estrutura proteica das enzimas, modificando suas propriedades como estabilidade e atividade podendo ocasionar conseqüências danosas ao metabolismo dos seres vivos (BAIRD, 2002). O principal transporte proteico do níquel é feito pela albumina, proteína que compõe o plasma sanguíneo, solúvel em água e soluções salinas (SCHROEDER, 1970).

Na **Figura 1a**, curva dose reposta, pode-se observar o comportamento de um metal essencial ao organismo, para o qual, inicialmente, o aumento da concentração promove melhoria em seu desenvolvimento, que passa de deficiente para ótimo. No entanto, acima de uma concentração conhecida como ótima, que é específica para cada metal, o metal passa a exercer uma influência tóxica sobre o desenvolvimento do ser vivo, sendo que há um limiar de concentração, acima do qual o metal é letal. Já na **Figura 1b**, está representando o comportamento de um metal não essencial ao organismo. Para este, há uma faixa de concentração em que o organismo tolera sua presença. Ademais, acima de determinados limites de concentração, este se torna tóxico e, em seguida, letal. É importante salientar que a condição de essencial não é característica única dos metais, ocorrendo com outros elementos químicos (LIMA & MERÇON, 2011).

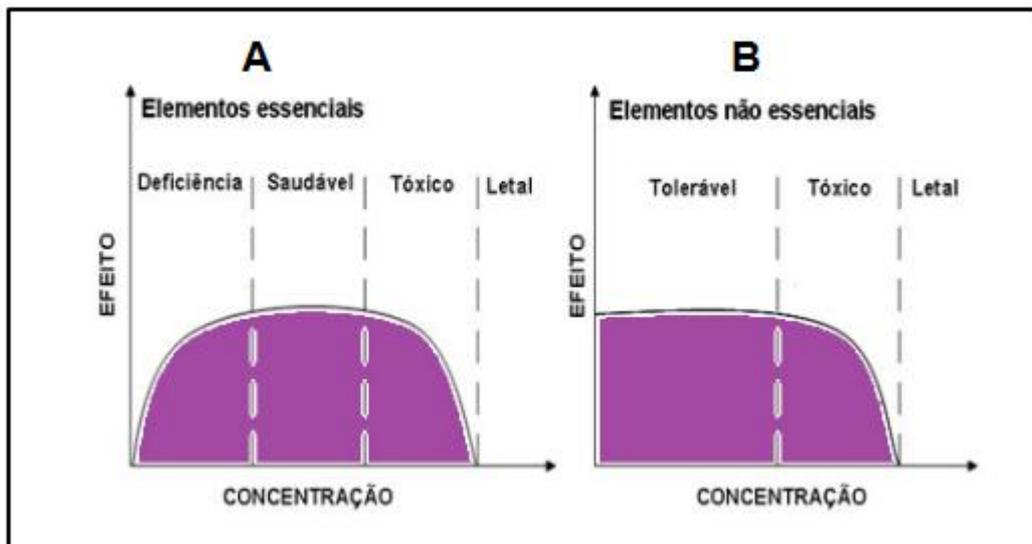


Figura 1. Curva dose resposta. Efeitos de metais no organismo em relação à sua concentração: (A) elementos essenciais e (B) elementos não essenciais. “Adaptado de Lima & Merçon (2011)”.

Ainda não está bem esclarecido o papel do níquel no crescimento /desenvolvimento (KIILUNEN, 1987) do ser humano. No entanto estudos realizados por Anke *et al.*, (1984) mostra que o níquel é importante ao crescimento de animais.

De acordo com DURÃES *et al.*, (2007) a exposição ao níquel em pequena quantidade não traz riscos à saúde, porém, quando estas doses excedem 1,0 mg/L seu potencial de toxicidade aumenta, o que pode ocasionar doenças como dermatoses, rinites, ulcerações, perfurações do septo nasal e até câncer. Conforme estudos realizados na década de 1980, a média diária de consumo de níquel é cerca de 0,15 mg/dia. Na água potável, por exemplo, contém níquel também em pequenas quantidades (0,001 a 0,010 mg/L). Alimentos como a aveia, chocolate, cacau, nozes, produtos de soja, legumes secos são alimentos ricos em níquel (DOLL, 1981). De acordo com este autor, doses superiores a 11,0 mg/L de níquel podem ser encontradas em áreas de mineração, o que representa um risco à saúde de pessoas que trabalham em áreas onde há contínua exposição deste mineral.

A IARC (Internacional Agency for Researchon Câncer) estima que cerca de 180.000 toneladas de níquel sejam lançadas no ambiente a partir da queima

de combustíveis fósseis e de processos industriais. Além disso, também pode ocorrer aumento da concentração relativa de níquel em casos de desastres ambientais. Segundo o Glossário da Defesa Civil Nacional, “desastre” é o resultado de eventos adversos, naturais ou provocados pelo homem, sobre um ecossistema, causando danos humanos, materiais e/ou ambientais e consequentes prejuízos econômicos e sociais. Quanto à medida de intensidade de um desastre vai depender, da interação entre a magnitude do evento e o grau de vulnerabilidade do sistema receptor afetado (TOMINAGA 2009; CASTRO, 1990).

Nessa percepção, o acidente ambiental ocorrido em 5 de novembro de 2015, no subdistrito de Bento Rodrigues a 35 km do centro do município brasileiro de Mariana (Minas Gerais), trata-se de um desastre, em que a barragem de rejeitos de mineração, conhecida como barragem de Fundão, controlada pela *Samarco Mineração S. A* rompeu-se. Por toda a extensão do Rio Doce nos estados de Minas Gerais e do Espírito Santo, verificou-se a mudança do aspecto de todo o rio, pela elevada turbidez gerada pela onda de lama de rejeitos, ou seja, resíduos de mineração. Ademais, os resultados de uma análise preliminar das amostras de água de rios afetados pelo rompimento da barragem apontou para alteração do parâmetro de teor de níquel, dentre outros.

De acordo com a Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 357 de 17 de março de 2005, o teor máximo de níquel permitido em águas de abastecimento é de 0,025 mg/L e também a Legislação Brasileira, através da Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011, estabelece limites máximos para a emissão de níquel em efluentes aquosos sendo o valor de 2,0 mg/L (Ministério do Meio Ambiente, MMA).

Para avaliar os riscos da exposição de metais à saúde é fundamental considerar a biodisponibilidade destes no organismo, fator que depende de suas características como solubilidade, forma, tamanho (BARRA *et al.*, 2000). O Níquel pode entrar no organismo essencialmente por três vias: (1) percutânea (2) inalatória e (3) via oral, sendo que a principal via de penetração

dos compostos de níquel no organismo é a respiratória (WHO, 1991). A absorção dependerá da solubilidade do composto inalado e do diâmetro aerodinâmico das partículas (a porção inalável é de partículas menores que 5 μm).

SCHROEDER (1970) fez uma estimativa que 75% do níquel inalado é retido no corpo e 25% é expirado, mas que isso dependerá da distribuição do diâmetro aerodinâmico das partículas. Sabe-se que partículas de níquel podem se acumular principalmente nos pulmões, rins e fígado e a principal via de excreção ocorre através da urina (WHO, 1991). Resultados de estudos realizados com trabalhadores de mineradoras sugeriram que o tempo necessário para que metade do níquel seja removido do organismo é de 17 a 39 horas pela urina e de 20 a 34 horas pelo plasma (FRANCHINI, 1984).

Segundo DOLL (1981) a principal exposição é ocupacional, dentro da mineradora e, especialmente, no setor de refino porque os trabalhadores estão expostos frequentemente a óxidos, sulfetos e à sais solúveis de níquel de vários tamanhos. Existem vários estudos epidemiológicos relatados pela IARC que avaliam a ocorrência de câncer em trabalhadores de refinarias de níquel em diferentes países. Em um desses estudos, realizado com aproximadamente 55.000 trabalhadores que trabalharam 26 anos em diferentes setores (mineração, calcinação, sinterização, fundição) de diferentes fábricas da INCO (The International Nickel Company, Ontário – Canadá), foi relatada a seguinte incidência de morte por câncer: 19 mortes em decorrência de câncer pulmonar entre os que trabalharam somente no setor de eletrólise por mais de cinco anos, e 10 para aqueles que trabalhavam apenas cinco anos. As concentrações estimadas de exposição aos contaminantes foram menores que 0,2 mg/m^3 para o óxido de níquel; menor que 0,5 mg/m^3 para o sulfeto de níquel, menor que 0,3 mg/m^3 para o níquel solúvel e menor que 0,5 mg/m^3 para o níquel metálico.

Este estudo mostra a importância de se compreender a toxicidade do níquel a fim de se evitar danos à saúde dos trabalhadores que ficam expostos à contaminação por resíduos metálicos. Assim, uma das estratégias poderia

ser baseada na identificação de níveis de exposição dos trabalhadores ao metal e relacionar esta exposição às características das partículas em que estes têm contato por via inalatória e/ou cutânea.

1.2. Nanotecnologia e Nanotoxicologia

O termo nanotecnologia é usado para denominar o ato de manipular materiais em uma faixa de tamanho que não exceda a 100 nanômetros (10^{-9} m = 1 nm). Na **Figura 2** está representado um breve comparativo com relação aos tamanhos dos materiais que são considerados nanométricos e os que não estão, de acordo com BAI & LIU (2013). Um fio de cabelo, por exemplo, pode medir 100.000 nm, já hemácias estão na faixa de tamanho de 10.000 nm, o tamanho de um vírus na faixa de 100 nm, os nanotubos de carbono possuem um diâmetro na faixa de 10 nm e átomos e moléculas aproximadamente 1 nm (TOMA, 2004).

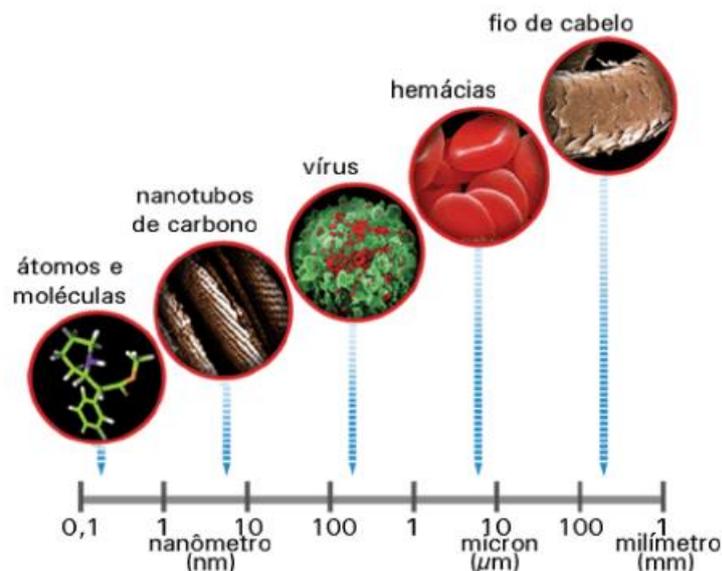


Figura 2. Esquema representativo das dimensões de algumas estruturas e suas respectivas escalas. “Adaptado de Toma, (2004)”.

Vários nanomateriais têm sido amplamente investigados na última década. Dentre esses, nanopartículas podem apresentar diversas aplicações. Isto se deve, em parte, ao fato de uma composição química semelhante poder conduzir a diferentes propriedades físicas e químicas e, conseqüentemente,

biológicas, em comparação com o mesmo material em escala macroscópica (“bulk”). Em particular, nanopartículas de óxido de níquel (NiO-Nps) são promissoras devido à suas propriedades catalíticas, magnéticas e eletrônicas e outras características como ampla área de superfície, propriedades de adsorção não usuais e difusividades térmicas (WU *et al.*, 2007).

Nanomateriais podem ter origem: (1) natural, como a estrutura de um vírus; (2) inorgânica que ocorre através do crescimento de cristais e (3) origem sintética como os nanomateriais manufaturados que são os produzidos propositalmente. Ainda se destaca a produção de nanopartículas de origem antropogênicas, ou seja, derivada de atividades humanas como fumos metálicos, subprodutos de processos da mineração, exaustão de veículos a diesel, combustão de carvão, dentre outros (BUZEA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos o interesse por produzir materiais nanoestruturados com propriedades desejadas para aplicações biomédicas tem crescido de forma acelerada. Os nanomateriais podem ser usados na área de diagnóstico e monitoramento de doenças e, na obtenção de sistemas para liberação sustentada de fármacos (LIU *et al.*, 2013). Já na indústria cosmética (MORGANTI, 2010) e têxtil (WONG, 2006) a nanotecnologia tem sido aplicada para a criação de produtos. Assim, a exposição humana a estes nanomateriais de forma intencional ou não parece inevitável, surgindo então dentro da nanotecnologia uma nova área de interesse e de extensiva pesquisa, a nanotoxicologia.

O termo “nanotoxicologia” apareceu pela primeira vez no início deste século para definir uma nova subcategoria da toxicologia (DONALDSON *et al.*, 2004). Análises nanotoxicológicas têm como propósito identificar a toxicidade de nanomateriais e são essenciais para o desenvolvimento de formulações não tóxicas ou que apresentem baixa toxicidade.

Pesquisas apontam que nanomateriais, por apresentarem pequena dimensão, podem ter maior permeabilidade através da pele, mucosas e membranas celulares, podendo ter seu efeito tóxico magnificado, já que

possuem superior reatividade, principalmente devido ao aumento da sua área superficial em relação a materiais maiores que 100 nm. Um exemplo clássico é o ouro, que é um metal praticamente inerte, mas que na forma de nanopartículas se torna altamente reativo (FARRÉ *et al.*, 2008).

A toxicidade de metais e de NPs metálicas tem sido amplamente estudada (MAGAYE *et al.*, 2012; CAPASSO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2003; MAGAYE & ZHAO, 2012; MORIMOTO *et al.*, 2011). Contudo, ainda persistem muitas incertezas que justificam uma intensificação dos estudos sobre os potenciais efeitos adversos destes materiais para avaliação de seu risco à saúde.

Alguns estudos têm relatado que o níquel metálico e as nanopartículas de óxido de níquel demonstraram significativa toxicidade após sua administração gota a gota na traquéia de ratos (OGAMI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2003). Assim, a exposição por inalação ao níquel e por nanopartículas de óxido de níquel representam um risco à saúde das pessoas constantemente expostas ao contato com estes materiais (CHOI *et al.*, 2007).

O conhecimento da relação entre as propriedades de nanomateriais e sua toxicidade ainda não está bem esclarecido. Todavia a caracterização física e química das NPs representa um passo importante nos estudos de nanotoxicologia no sentido de avaliar o potencial efeito citotóxico, identificar as suas possíveis vias de exposição e prever os riscos relacionados com a sua síntese e utilização. Além disso, outro fator importante quanto ao estudo refere-se ao tipo de célula investigada. Com efeito, cada tipo celular tem sua peculiaridade e, portanto, não responde da mesma maneira, ainda que após exposição a um único nanomaterial (MONTEIRO & TRAN, 2007).

Os ensaios farmacocinéticos para fim de avaliar o risco no uso de NPs são importantes para identificação de doses, locais de ação, via de administração etc. Ainda os conhecimentos sobre, distribuição, metabolização e eliminação de nanopartículas também são necessários, pois estes parâmetros podem influenciar a absorção das mesmas em tecidos biológicos (MONTEIRO & TRAN, 2007).

Os ensaios de citotoxicidade possibilitam a avaliação do potencial toxicológico de um dado nanomaterial em culturas de células (*in vitro*) que são submetidas sob condições controladas e, conseqüentemente, reprodutíveis. Ainda, os métodos de estudo *in vitro* propiciam também a simplificação de um fenômeno biológico ao ponto de interações celulares e moleculares poderem ser analisadas individualmente. Além disso, é possível a análise da interação célula-nanopartícula. Porém nesses ensaios, os tipos celulares e parâmetros avaliados devem ser planejados de acordo com o tipo de nanopartículas analisadas e com os objetivos do pesquisador (CHMALZ, 1994).

O desenvolvimento de cultura de células com o uso de diversas linhagens, cada qual com características próprias, constituíram-se numa forma para se conhecer os mecanismos pelos quais os nanomateriais podem produzir reações adversas ao nível celular. Assim, mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem, por exemplo, ser avaliadas (LYGRE *et al.*, 1995). Por outro lado, estudos *in vitro* podem apresentar resultados limitados em determinadas condições e não necessariamente refletir situações biológicas reais (GOLDSBY *et al.*, 2008).

A viabilidade celular é um dos parâmetros mais utilizados nos ensaios de citotoxicidade por se tratar de uma análise relativamente rápida, simples e de baixo custo. Dentre alguns dos métodos que avaliam a viabilidade celular, o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um dos mais utilizados em cultura de células, pois com este ensaio pode ser determinada a atividade de enzimas denominadas de desidrogenases mitocondriais. Estas enzimas clivam o anel tetrazólio do MTT, formando um cristal insolúvel de formazan de cor roxa que é solubilizado após adição de DMSO (dimetilsufóxido) (HEO, 1990). Os sais de tetrazólio (MTT) são reduzidos através de uma reação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo succinato tetrazólio redutase presente somente em células viáveis (**Figura 3**). A absorbância da solução pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MOSMANN *et al.*, 1993).

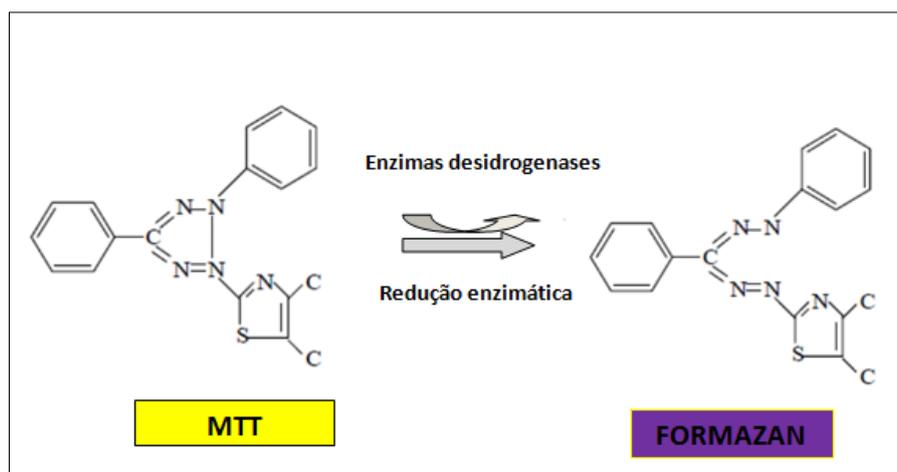


Figura 3. Representação esquemática da reação de redução de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). “Adaptado de Cory *et al.*, (1991)”.

No presente trabalho, a fim de se avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel por MTT, foram usadas cultura de células oriundas da pele da linhagem HaCat (queratinócitos humanas) e do tecido conjuntivo da linhagem NIH-3T3 (fibroblastos de camundongo). Queratinócitos são produzidas pelas células da camada basal e sintetizam a queratina, que migra para a superfície, podendo ser progressivamente transformado em uma camada córnea ou queratinizada. Outrossim, fibroblastos são as células mais abundantes do tecido conjuntivo e apresentam duas importantes funções: (1) produção de substância intercelular e (2) origem células de outros tecidos conjuntivos que são responsáveis pela renovação tecidual (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

1.3. Preparação de nanopartículas

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas inúmeras técnicas para a preparação de nanopartículas (LIU *et al.*, 2013; CHEN & HSIEH, 2002), e grande parte dos estudos estão centralizados na preparação de nanomateriais de metais nobres (PRADEP & ANSHUP, 2009).

Em geral, para a produção de nanopartículas são utilizados métodos físicos e/ou químicos. Os métodos físicos são também conhecidos como “*top*

down” e são aqueles em que se manipula o material em escala macro (*bulk*) até que estes fiquem em escala nanométrica (10^{-9} nm). Sonólise e nanolitografia são exemplos deste método de preparação (OZIN, 1992). Já os métodos químicos, conhecidos como “*botton-up*”, possibilitam um maior controle sobre o processo de preparação de nanopartículas. Tais métodos baseiam-se em reações químicas e utilizam precursores moleculares ou atômicos para a obtenção das nanopartículas desejadas. Na **Figura 4** está representado um esquema relacionando os métodos “*top down*” e “*botton-up*”.

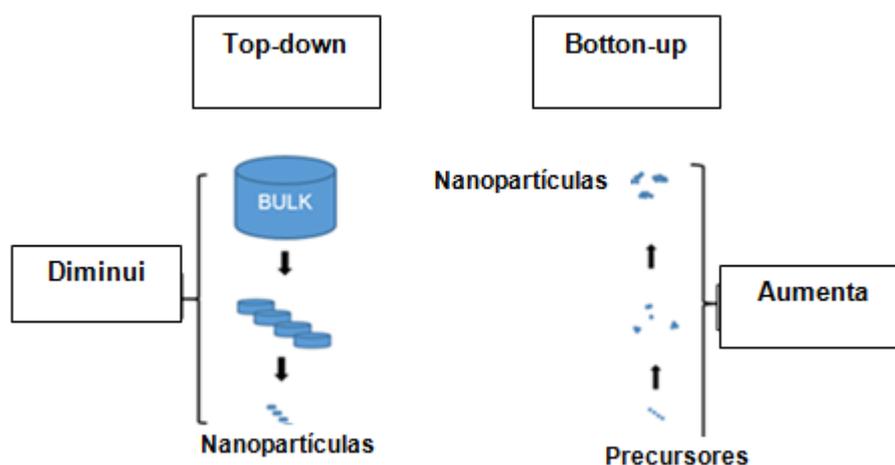


Figura 4. Representação esquemática dos principais métodos de obtenção de nanopartículas conhecidos como *top down* e *botton-up*. “Adaptado de Thassu *et al.*, (2007)”.

1.3.1. Estabilização coloidal de nanopartículas

As dispersões de partículas nanométricas em fase líquida estão caracterizadas por um estado de equilíbrio entre as forças atrativas do tipo de *Van der Waals* e repulsivas, que podem ser de natureza elétrica ou estérica (EVERET, 1988; ODENCBACH *et al.*, 2004). Os mecanismos de estabilização de partículas coloidais, ou seja, na faixa de 1 nm a 1 μ m estão esquematizados na **Figura 5**.

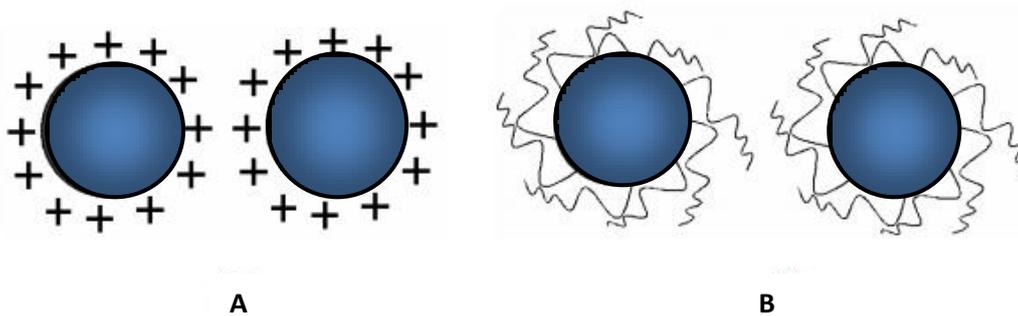


Figura 5. Mecanismo de estabilização de partículas em suspensões: A) estabilização de partículas por carga e B) estabilização por efeito estérico. “Adaptado de Couto *et al.*, (2007)”.

As partículas tendem a aderir umas às outras quando as interações atrativas são dominantes, levando à aglomeração e posterior sedimentação. Por outro lado, quando as interações repulsivas predominam, a dispersão permanece estável (EVERETT, 1988). A estabilidade a partir de interações eletrostáticas ocorre devido a presença de cargas elétricas que surgem como consequência de reações químicas que ocorrem na interface partícula-meio. Assim, uma vez que as partículas possuem superfície carregadas, um potencial de superfície é desenvolvido e então quando duas partículas de mesmo sinal se aproximam, a barreira de potencial eletrostático impede a agregação dessas partículas, consequentemente levando à sua estabilização (**Figura 5 A**) (HUNTER, 1986).

Na estabilização estérica, as NPs são neutras e sua aproximação é dificultada por uma camada protetora de outro material, denominada camada passivadora, que evita a aproximação das mesmas por causa das cadeias das moléculas que foram adsorvidas à superfície, conforme demonstrado na **Figura 5 B**. Este tipo de estabilização pode ser favorecido por adição de surfactantes, polímeros, dentre outros materiais (ATKINS, 2000). Assim, quando as partículas se aproximam, as cadeias das moléculas adsorvidas na superfície ficam limitadas ao pequeno espaço entre as partículas e perdem um pouco da entropia conformacional, o que gera repulsão entre as cadeias e, consequentemente, entre as partículas (EVERETT, 1988).

A dispersão também pode ser estabilizada através da combinação dos mecanismos estérico e eletrostático, um exemplo é quando um polieletrólito é adsorvido ou ligado quimicamente à superfície de uma partícula coloidal (HUNTER, 1986).

1.4. Nanopartículas de óxido de níquel e suas peculiaridades

Várias vias para a produção de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs) já foram investigadas tais como a decomposição térmica (WANG *et al.*, 2002; HOSNY, 2011; LI *et al.*, 2006), técnica sol-gel (XIANG *et al.*, 2002), pirólise de microondas (WANG & KE, 1996), solvotérmica (ANANDAN *et al.*, 2011), de plasma a arco anódica (WEI *et al.*, 2009), sonoquímicas (MOHSENI *et al.*, 2012), precipitação-calcinação (DENG & CHEN, 2004) e microemulsão (DU *et al.*, 2012). Porém, o problema desses métodos tradicionais é que as partículas formadas ficam aglomeradas e, na maioria dos casos, há a dificuldade no controle do tamanho e forma, o que pode restringir muito sua aplicação em diversas áreas, especialmente na área biológica (KASHEVSKY *et al.*, 2008).

O método de obtenção de hidróxido metálico com posterior decomposição térmica (**Figura 6**) é frequentemente usado para preparar nanopartículas de metais de transição especialmente na síntese de nanopartículas de óxido de níquel. Algumas vantagens desta técnica é que não é necessário a utilização de equipamentos sofisticados, de temperaturas elevadas ou de pressurização do sistema (MAKHLLOUF *et al.*, 1997). No caso de produção de nanopartículas de óxido de níquel, esta via de síntese consiste na produção de hidróxido de níquel pela adição de sais de níquel (acetato, cloreto, nitrato entre outros) a um hidróxido e/ou solventes (água ou etanol).

A eliminação de sais solúveis (cloreto de sódio) formados por meio desta via pode ser feita por repetitivas lavagens do produto com água destilada. O hidróxido formado é normalmente centrifugado, lavado com água destilada e tratado termicamente com temperaturas elevadas a partir de 400 °C. O aquecimento provoca a decomposição do hidróxido de níquel (Ni(OH)₂)

formando o óxido de níquel (NiO) (MOHAMMADIJOOA *et al.*, 2014). O esquema desse processo pode ser visualizado na **Figura 6**.



Figura 6. Demonstração esquemática dos compostos e procedimento utilizados para síntese de NiO-NPs através do método de obtenção de hidróxido metálico com posterior decomposição térmica.

As NiO-Nps tem uma grande variedade de aplicações na fabricação de materiais magnéticos, como cátodos de baterias alcalinas, em células solares sensibilizadas com corante, semicondutores, células de combustível de óxido sólido (SOFC), camadas anti-ferromagnéticas, filmes eletrocromáticos, materiais heterogêneos catalíticos e sensores de gás (FUKUI *et al.*, 2000; IZAKI *et al.*, 1998; HOTOVY *et al.*, 1999; BI *et al.*, 2004; ICHIYANAGI *et al.*, 2003; BIJU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 1997; BANGS *et al.*, 1996).

Já o pó nanocristalino de óxido de níquel (NiO) tem efeito de superparamagnetismo, com potencial para ser utilizado na entrega de fármacos em regimes quimioterápicos e como agente de contraste para uso em ressonância magnética (RICHARDSON *et al.*, 1991). No entanto, para tais aplicações é necessário conhecer o potencial citotóxico desse nanomaterial, sendo que a toxicidade de compostos metálicos pode estar relacionada com pelo menos três tipos de influência físico-química como: (1) bloqueio de grupos funcionais essenciais na atuação de uma biomolécula; (2) deslocamento de outros metais presentes no sistema; (3) modificações na conformação de sítios ativos e na estrutura quaternária de proteínas (GUTHRIE & PERRY, 1980; HAMOND & BELILES, 1980).

1.5. Técnicas de análise e caracterização de nanopartículas

A produção e o desenvolvimento de metodologias analíticas para a rápida e rigorosa caracterização dos nanomateriais é de especial interesse para o desenvolvimento da nanotecnologia. Assim, a compreensão de características físicas e químicas, como o tamanho e a composição de nanopartículas é particularmente importante. Várias são as técnicas disponíveis para a caracterização dos nanomateriais e da sua superfície química. Desse modo, a escolha adequada das técnicas de caracterização deve ser condizente com o tipo de informação que cada técnica pode fornecer e, principalmente, deve-se considerar a complementaridade entre as diversas técnicas.

No presente trabalho, foram escolhidas as seguintes técnicas de caracterização das nanopartículas e das suspensões: análise termogravimétrica (TG); análise de difração de raios - X (DRX); análise de área superficial (B.E.T), microscopia eletrônica de transmissão (MET); espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS); infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); espectroscopia de absorção atômica (EAA) e espelhamento de luz dinâmico. A definição, aplicações e características de cada uma destas técnicas estão descritas no **Apêndice A**.

1.6. Mecanismos de internalização de nanopartículas

O conhecimento da via de internalização ou captação de NPs é um dos aspectos mais importantes para estudos de toxicidade de nanomateriais. Há diversas pesquisas que indicam diferentes mecanismos de internalização de nanopartículas pelas células, sendo o processo de endocitose o mais provável. O processo de endocitose é uma forma ativa de transporte, onde a célula retém o nanomaterial por via da formação de vesículas ou vacúolos na membrana citoplasmática. Assim, este tipo de transporte engloba dois mecanismos de internalização de nanomateriais pelas células, a fagocitose e a pinocitose (**Figura 7**) (CHITHRANI, 2007).

Partículas com 50 nm de tamanho são mais rapidamente internalizadas quando comparadas à partículas menores (abaixo de 14 nm) e maiores (até 500 nm) (MAHMOOD *et al.*, 2012). O mecanismo predominante na internalização de partículas com tamanho superior a 500 nm é a fagocitose. Este mecanismo é restrito a determinados tipos de células como é o caso dos monócitos (ZHAO *et al.*, 2011). Já o mecanismo de pinocitose, que pode ser observado por todos os tipos de células, pode ocorrer por, pelo menos, quatro vias diferentes: a macropinocitose, endocitose mediada pela clatrina, endocitose mediada pela caveolina e endocitose por vias alternativas. A macropinocitose caracteriza-se por formar saliências membranares, com mais de 1 μm , em que são englobadas grandes porções de fluido de uma forma não específica. Já a endocitose mediada pela clatrina normalmente ocorre em regiões específicas da membrana celular que possuem a proteína clatrina. Sendo que partículas na faixa de 120 - 150 nm podem ser internalizadas dentro das vesículas de clatrina.

Por outro lado a endocitose mediada pela caveolina formam-se invaginações em forma de balão com tamanhos de 50 a 80 nm nos domínios hidrofóbicos da membrana plasmática. Além destes mecanismos dependentes da clatrina e caveolina, outros mecanismos independentes podem levar à internalização de nanomateriais pelas células (KETTIGER *et al.*, 2013).

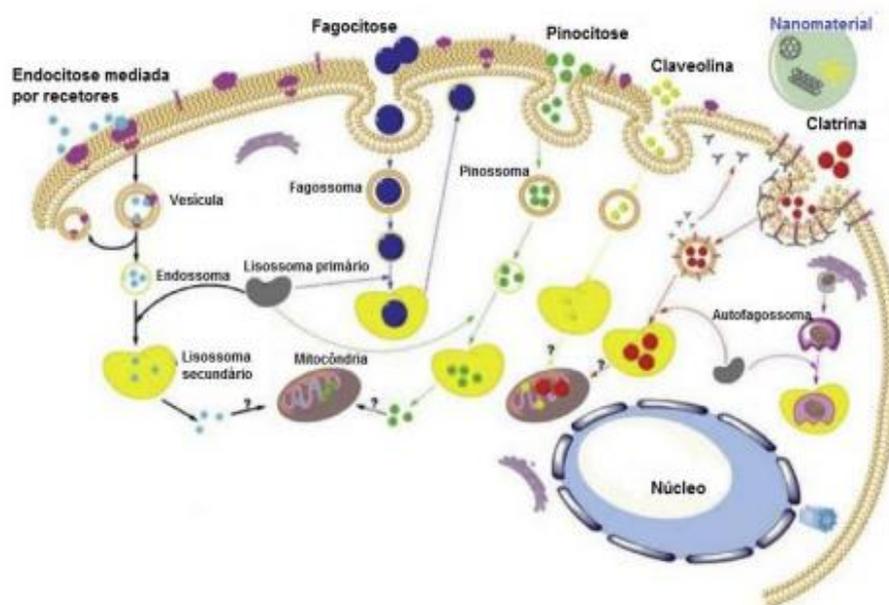


Figura 7. Representação esquemática das principais vias de internalização de nanopartículas pelas células. “Adaptado de Zhao *et al.* (2011)”.

A captação de nanopartículas pelas células pode ser influenciada por características como tamanho, carga, características da superfície e estrutura das mesmas. Desta forma, o conhecimento acerca destas características é primordial, visto que a toxicidade de nanomateriais está associada à captação destes pelas células, a qual por sua vez, é influenciada pelas características físicas e químicas dos mesmos (MUÑOZ & COSTA, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

As nanopartículas constituem-se como produto final ou subproduto de uma grande variedade de processos físicos, químicos e biológicos. Estas podem apresentar propriedades e comportamentos diversificados, o que torna impossível fazer uma apreciação genérica de seus riscos à saúde e ao meio ambiente. Por exibirem uma elevada área superficial (razão superfície/volume) surgem novas propriedades como maior reatividade química e, conseqüentemente, maior atividade biológica e catalítica quando comparadas com partículas macroscópicas da mesma composição química (BAI & LIU, 2013).

Contudo, o rápido desenvolvimento da nanotecnologia contrasta com a insuficiente avaliação de risco do uso de nanomateriais para o ambiente e para a saúde humana, especialmente aqueles envolvendo riscos ocupacionais. Estudos mostraram que a principal forma de contaminação por exposição ocupacional é a inalação de nanomateriais, os quais por sua vez, vão para a corrente sanguínea. Além disso, a contaminação por nanomateriais também pode ocorrer através da pele. Em 2009, especialistas da Agência Europeia para Segurança e Saúde no Trabalho identificaram que o contato com nanopartículas pode representar uma ameaça à saúde, haja vista sua potencial toxicidade em decorrência de contato com resíduos ou subprodutos industriais oriundos da sua formação (GUAZZELLI & PEREZ, 2016).

Nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs) possuem propriedades únicas que as tornam atraentes, pois podem ser usadas em produtos industriais a fim de promover aplicações tecnológicas inovadoras (FUKUI *et al.*, 2000; MOHSENI *et al.*, 2012). Todavia, foi reportado que NiO-NPs induzem tanto efeitos citotóxicos como genotóxicos (MAGAYE & ZHAO, 2012).

Contudo, ainda não existem estudos sobre a ação tóxica de nanopartículas baseadas em níquel no organismo de trabalhadores, especialmente os da indústria mineradora. Apesar do Brasil ser um grande exportador de níquel e apresentar uma das maiores jazidas do mundo.

O município de Niquelândia localizado no estado de Goiás (Brasil) encontra-se em uma região com grandes jazidas de níquel, onde existem empresas que fazem a extração e o refino deste metal com mais de mil funcionários que trabalham de forma direta e indireta no processo de refino. Tendo em vista que podem ser formadas nanopartículas de óxido níquel no processo de refino desse minério e que a exposição do trabalhador a estes nanomateriais é um fato (produção de nanopartículas antropogênicas), é imprescindível e urgente estudos que possam avaliar a potencial toxicidade destes nanomateriais em células saudáveis (HELLE *et al.*, 2009).

Neste estudo foi avaliado o potencial citotóxico de nanopartículas de óxido de níquel em cultura de células saudáveis (fibroblastos e queratinócitos) a fim de se considerar estes resultados como um indicativo ou não de risco à saúde de trabalhadores que, inevitavelmente, tem constante contato por inalação ou pela pele com possíveis nanopartículas formadas acidentalmente durante o refinamento do níquel.

Além disso, esse estudo poderá complementar informações existentes na literatura quanto à síntese de NiO-NPs visto que, em nosso trabalho, foram utilizados alguns parâmetros diferentes para produção de NiO-NPs como distintas condições de síntese, temperatura e/ou solvente. Assim, elaboramos três hipóteses norteadoras do nosso estudo sendo estas:

- (1) “As NiO-NPs induzem efeitos citotóxicos de forma dose dependente? ”
- (2) “As NiO-NPs induzem efeito citotóxico dependente do tipo celular?”
- (3) “As características físico-químicas das NiO-NPs estão relacionadas com o aumento da sua toxicidade?”

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Sintetizar, caracterizar e investigar a citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs) em cultura de células normais de linhagens de fibroblastos (NIH-3T3) e de queratinócitos (HaCat).

3.2. Específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs) por diferentes metodologias e dispersar as nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs) em água ultrapura (suspensões aquosas);
- Caracterizar física e quimicamente as NiO-NPs por meio de: análise termogravimétrica, difração de raios - X, área superficial, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de infravermelho, e espectroscopia de raios - X de energia dispersiva.
- Caracterizar as suspensões por meio de espalhamento dinâmico da luz, pH e absorção atômica.
- Verificar se as NiO-NPs induzem citotoxicidade em cultura de células de fibroblastos (NIH-3T3) e de queratinócitos (HaCat) por meio de análises de viabilidade celular através do ensaio colorimétrico do MTT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho Experimental

A parte experimental deste trabalho foi realizada em etapas, conforme representada na **Figura 8**. Três distintas formulações de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs) foram preparadas no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ-UFG) no Laboratório de Síntese Inorgânica.

As formulações de NiO-NPs foram avaliadas quanto à sua composição, estrutura, textura, morfologia e estabilidade em água ultrapura. Posteriormente foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando o método colorímetro de MTT.

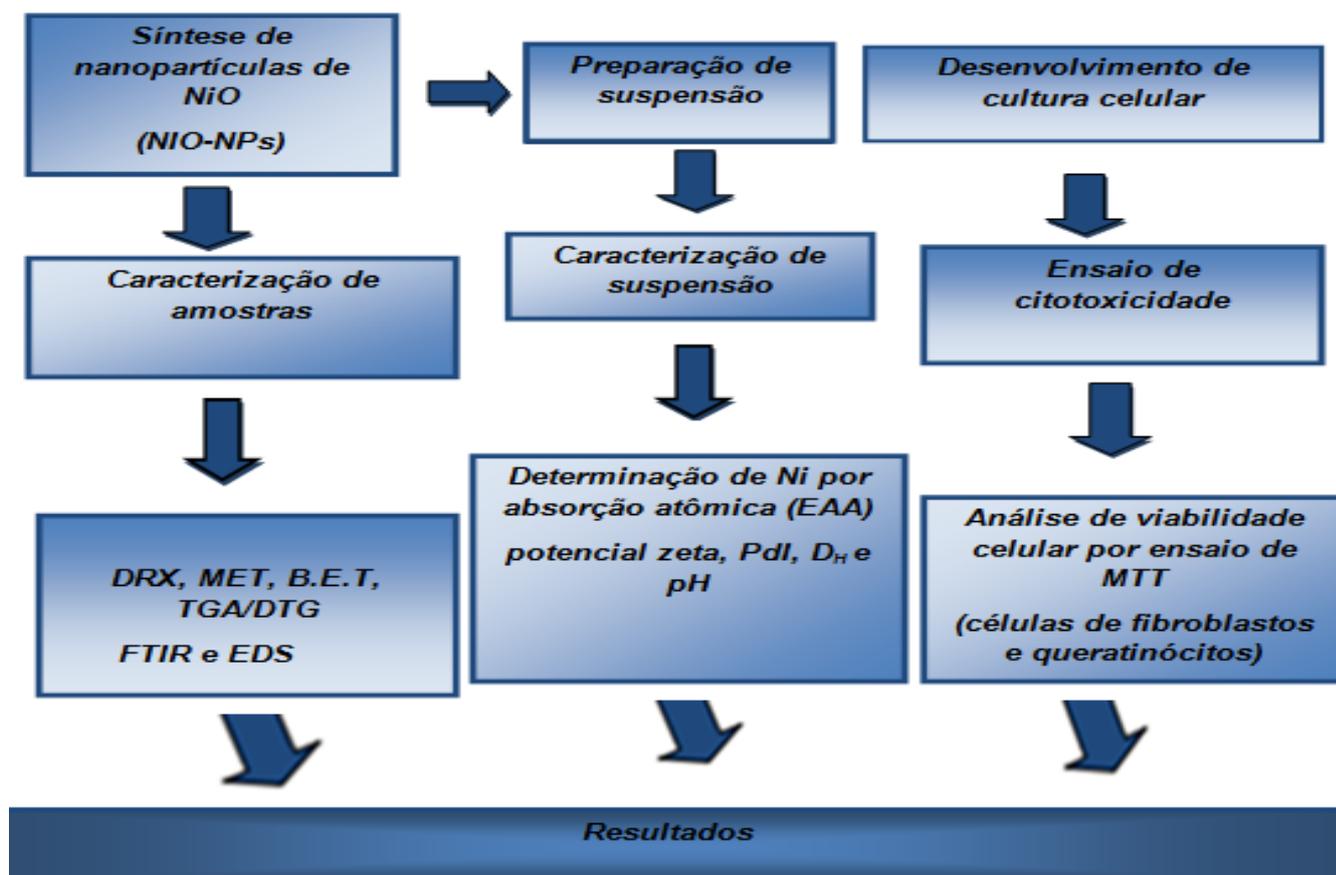


Figura 8. Esquema representativo do desenho experimental conduzido neste estudo. Síntese de NiO-NPs; caracterização das NiO-NPs por DRX, MET, EDS, B.E.T., TG/DTG, FTIR); caracterização das suspensões de NiO-NPs utilizando os parâmetros: PDI, DH, PZ e EAA; ensaio colorímetro de viabilidade celular: MTT

4.2. Síntese - hidróxido de níquel Ni(OH)_2 e nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs)

As três metodologias distintas das formulações de Ni(OH)_2 e NiO-NPs foram denominadas de acordo com o tipo de precursor metálico utilizado e/ou solvente. Assim, a nomenclatura -Cl foi usada sempre que nos referimos ao uso de cloreto de níquel (anidro) como precursor metálico; a nomenclatura -Et, quando usado o cloreto de níquel (II) hexahidratado em solução alcoólica; e a nomenclatura -OAc quando usado acetato de níquel (II) tetrahidratado como precursor metálico.

4.2.1. Síntese de hidróxido de níquel (Ni(OH)_2 -Cl)

Para síntese destas nanopartículas primeiramente foi utilizado um balão de fundo chato com duas juntas (capacidade de 50 mL) colocado em banho de areia, com agitador magnético, termômetro digital e um funil de adição, montado sobre uma placa de aquecimento associada a um regulador de voltagem. Esses equipamentos foram montados conforme é mostrado na **Figura 9**. O conjunto foi bem fixado em suporte metálico de modo a garantir a estabilidade desta aparelhagem.



Figura 9. Aparelhagem utilizada na síntese de Ni(OH)_2 -Cl.

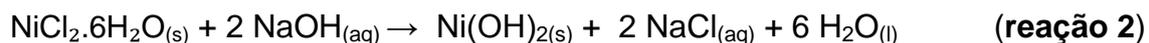
A reação estequiométrica de síntese está apresentada abaixo conforme **reação 1**:



As nanopartículas de óxido de níquel foram sintetizadas, pela adição gradual de 20 mL de hidróxido de amônio concentrado (NH_4OH - Dinâmica P.A), em 2 g de cloreto de níquel anidro (NiCl_2 - Análítica 99,9%), sob vigorosa agitação (450 g). Devido à reação exotérmica, o hidróxido de amônio foi adicionado lentamente ao precursor NiCl_2 . A temperatura da solução foi ajustada para 75 °C e a solução foi submetida à agitação magnética até a completa evaporação da amônia. Posteriormente, foi adicionado água ultrapura como um agente precipitante e a solução foi mantida sob vigorosa agitação até formar um precipitado verde (hidróxido de níquel). Esta metodologia foi realizada de acordo com MOHAMMADIJOO *et al.* (2014).

4.2.2. Síntese de hidróxido de níquel ($\text{Ni}(\text{OH})_2$ -Et)

A reação estequiométrica de síntese está apresentada abaixo conforme **reação 2**

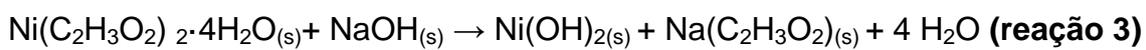


Os reagentes químicos foram utilizados diretamente das empresas sem purificação prévia. Em atmosfera ambiente, foram preparadas duas misturas reacionais, sendo 1,5 g cloreto de níquel (II) hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -

Análitica 99,9%) dissolvido em 70 mL de etanol absoluto (C₂H₆O - McCormick). Nesta etapa, formou-se uma solução verde clara. Adicionalmente, outra solução foi preparada usando 0,5 g de hidróxido de sódio (NaOH - MPEX, P.A) dissolvidos em 100 mL de etanol absoluto (C₂H₆O - McCormick) a mistura resultante das duas soluções foi submetida à agitação magnética à temperatura ambiente durante duas horas. Durante este período formou-se um gel verde (hidróxido de níquel). Estes procedimentos foram conduzidos com algumas adaptações de acordo com CARNES *et al.*, (2002).

4.2.3. Síntese de hidróxido de níquel (Ni(OH)₂-OAc)

A reação de produção de Ni(OH)₂-OAc é mostrada abaixo conforme **reação 3**:



O hidróxido de níquel foi preparado por trituração (em um almofariz de ágata) a partir de uma quantidade de 1 g de acetato de níquel (II) tetrahidratado (Ni(C₂H₃O₂)₂·4H₂O - VETEC, 99.50%) com 0,161 g de hidróxido de sódio (NaOH – IMPEX, P.A) e quantidade apropriada de polisorbato 80 (Tween 80 - Dinâmica), ou seja, até a mistura ter ficado totalmente homogênea, obtendo-se o hidróxido de níquel. Esta metodologia está de acordo com WANG *et al.*, (2005).

4.2.4. Calcinação de hidróxido de níquel para obtenção NiO-NPs (Cl, Et e OAc)

O hidróxido de níquel (-Cl e -Et) produzido foi filtrado. Posteriormente o hidróxido -Cl, -Et e -OAc foi lavado por seis vezes com água ultrapura e etanol e centrifugado. Para produzir NPs-NiO, o precipitado verde obtido nas

três sínteses foi seco a 100 °C durante 90 min em estufa e, em seguida, aquecido a 410 °C durante duas horas, em uma mufla. Esta metodologia foi realizada de acordo com MOHAMMADIJOO *et al.* (2014).

4.3. Preparação de suspensões aquosas de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) e caracterização.

As nanopartículas de óxido de níquel foram dispersas em água ultrapura com o objetivo de avaliar os efeitos da sua toxicidade em cultura de células. Para isto, foi adicionado 200 mL de água ultrapura à 1 g de nanopartículas de óxido de níquel. Em seguida, a suspensão foi conduzida ao ultra-som a uma potência de 450 W durante 90 minutos (Modelo 450; Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) para melhor dispersão das nanopartículas.

A suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi recolhido (cerca de 120 mL). Após este procedimento, a suspensão foi filtrada através de um filtro de papel de diâmetro de poro de 1 µm e esta suspensão filtrada foi utilizada para realização do ensaio de citotoxicidade. Esse procedimento experimental está de acordo com conduta relatada por ENDOH & UCHIDA (2008). As suspensões foram caracterizadas por meio de medidas de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, potencial hidrogeniônico e pela determinação da concentração de Ni por espectroscopia de absorção atômica.

4.3.1. Avaliação de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e Pontencial Zeta (PZ) das suspensões de NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc

O DH, PDI e PZ foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer nano series (Malvern Instruments). Alíquotas de 0,5 mL das suspensões foram diluídas em 2 mL de água ultrapura e as medidas de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão foram realizadas a 25 °C. As formulações foram analisadas no 7° e 15° dia após a

preparação. Durante todo o período de análise, as amostras foram estocadas sob refrigeração a 4 °C. O pH das suspensões foi verificado por fita indicadora.

4.3.2. Espectroscopia de Absorção Atômica

As análises foram realizadas em triplicatas e o valor da média obtida foi utilizado para o cálculo do teor de níquel em cada formulação. Assim, as análises de EAA foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção atômica por chama (Analyst 400 da Perkin Elmer) usando o espectro de 232 nm. Foram preparados padrões numa faixa de 0,4 a 18 ppm. As quantificações de níquel foram feitas nas suspensões das três diferentes sínteses. Para tal, alíquotas destas suspensões (1 mL) foram digeridas com 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e diluídas em 25 mL de água ultrapura.

4.4. Caracterização física e química das nanopartículas de óxido de níquel

4.4.1. Análise Termogravimétrica

As análises TG foram realizadas em equipamento SHIMADZU (modelo DTG-60). Aproximadamente 5 mg das amostras foram trituradas, peneiradas (peneiras de 200 *mesh*) e colocadas em cadinho de alumina com uma rampa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em um intervalo de 25 a 1000 °C sob fluxo de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹.

4.4.2. Caracterização por Difração de Raios- X

A DRX foi realizada pelo método de pó, usando um equipamento da marca SHIMADZU (modelo DRX 6000). Para a realização destas análises, as amostras foram trituradas em um almofariz de ágata e peneiradas (peneiras de aço de 200 *mesh*). Utilizou-se radiação CuK α ($\lambda = 0.154$ nm), 40 KV e 30 mA, usando a faixa angular de difração 2θ entre 10 e 80°, com uma velocidade de varredura contínua de 2°/minuto. Os dados de difração foram utilizados para confirmar a estrutura cristalina das nanopartículas. Já os cálculos de diâmetro

foram realizados utilizando os dados do difratograma e a equação de Scherer (CULLITY *et al.*, 1978).

4.4.3. Análise de Área Superficial

A análise de adsorção/desorção de nitrogênio permite determinar a área superficial, o volume e a distribuição de poros de um material. A área de superfície específica das nanopartículas foi determinada por este método denominado B.E.T., assim como o volume e a distribuição de poros pelo método BJH (Barret, Joyner and Halenda), utilizando-se o equipamento Micromeritics ASAP 2010. O nitrogênio foi utilizado como adsorvato. Os compostos calcinados foram secos a 100°C, triturados em almofariz de ágata, peneirados utilizando peneiras de aço de 200 *mesh*. As massas de formulações empregadas nos experimentos adsorção/desorção para NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc foram respectivamente de 0,294 g; 0,310 g e 0,211g.

4.4.4. Espectroscopia na Região Infravermelho

As nanopartículas de óxido de níquel foram analisadas por transmissão, usando equipamento FTIR, Bomem da série MB 100, na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} e fazendo 128 varreduras. As amostras foram diluídas em brometo de potássio (KBr) na proporção de 1% para posterior confecção das pastilhas.

4.4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Utilizou-se um microscópio eletrônico de transmissão da marca Jeol, JEM-2100, operando a 200 kV, equipamento localizado no LabMic (Laboratório de Microscopia do Instituto de Física, UFG). Foi usado o programa Image Pro Plus, para realizar a contagem de 200 nanopartículas para identificação do diâmetro modal das nanopartículas.

4.4.6. Análise composicional

Foi realizada pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios - X (EDS), usando um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), Jeol, JEM-2100 , equipado com EDS, Thermo scientific.

4.5. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

4.5.1. Cultura de células

Foram utilizados dois tipos de linhagens celulares sendo células de fibroblastos de origem murina (linhagem NIH-3T3) e queratinócitos (linhagem HaCat) de origem humana. As células foram estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanociência da Universidade de Brasília e, conforme necessário, descongeladas uma semana antes do ensaio, e aclimadas em um frasco para cultivo (25 cm², TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium*) suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantido em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Após as células atingirem confluência ideal (cerca de 1000.000) para os experimentos (cerca de 10³), elas eram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio de cultura DMEM era descartado e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato-salina (PBS). Logo após, as células eram incubadas com solução de tripsina EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37 °C. Adicionalmente, colocava-se meio DMEM às células para neutralizar a ação da tripsina e esta suspensão era centrifugada por 3 minutos a 300 g. Após a centrifugação, o sobrenadante era removido e o *pellet* de células era ressuspenso em meio DMEM (1 a 3 mL). Em seguida, uma alíquota da suspensão de células era usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

4.5.2. Tratamento das células

As suspensões aquosas das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc nas concentrações de 0,81 g/L, 0,63 g/L e 0,79 g/L, respectivamente, foram armazenadas em tubos falcon de 10 mL em geladeira. Estas suspensões foram produzidas conforme a necessidade do uso nos ensaios de citotoxicidade. Sendo analisada a concentração de níquel por EAA. A partir das suspensões estoque foram então realizadas diluições seriadas para obtenção das concentrações selecionadas para o tratamento das células (10, 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$).

Para realização dos experimentos, alíquotas de meio de cultura contendo 3×10^3 células/poço foram semeadas em placas de 96 poços (TPP) e incubadas por 24, 48 e 72 h em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. Após os períodos de tratamento das células com as suspensões descartou-se o meio e adicionou-se solução de 5 mg/mL de MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em meio de cultura fresco. Logo, as células foram mantidas por duas horas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂ para posterior análise da viabilidade celular em espectrofotômetro, conforme descrito abaixo.

4.5.3. Ensaio de citotoxicidade

Após a incubação das células, a solução de MTT e o meio de cultura foram removidos da placa e adicionou-se 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan formados. Tais sais são provenientes da metabolização do MTT pelas células e, por conseguinte, indicam a quantidade células viáveis. Em seguida, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Spectra Max M2, Molecular Devices), no comprimento de onda (λ) de 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada grupo experimental e repetido por três vezes.

4.6. Análise Estatística

A fim de de analisar possíveis diferenças na viabilidade das células entre os diferentes tratamentos com NiO-NPs realizou-se, inicialmente, um teste de repetibilidade para verificar o índice de correlação intraclassa (ICC) dos experimentos após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Assumido um resultado de boa repetibilidade ($ICC \geq 0,9$) destes, as variáveis foram testadas quanto ao tipo de distribuição por meio do teste de normalidade de Shapiro Wilk. Logo, a homogeneidade de variâncias foi analisada por meio do teste de Levene. Devido aos valores de significância de p encontrados nos métodos de Shapiro Wilk ($p > 0,05$) e no de Levene ($p > 0,05$) as médias foram analisadas por análise de variância (ANOVA) paramétrica two way (General Linear Model). Ainda, para comparações entre o controle (sem tratamento) e os tratamentos com NiO-NPs, em um dado tempo, foi utilizado ANOVA one way com pós teste de Dunnet (bicaudal).

Para avaliar se o tempo e a resposta de cada linhagem eram diferentes, para dados tratamentos, foi realizada uma ANOVA two way. Para isto foram calculados os intervalos de confiança 95% pela estratégia General Linear Model. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$) e as análises foram realizadas com auxílio do software de estatística SPSS® versão 17.0. Os gráficos foram gerados no GraphPrism versão 7.0. Os cálculos de IC 50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese

As sínteses das NiO-NPs foram realizadas três vezes. Sendo que foi necessário manter as características das NiO-NPs para a realização dos ensaios de citotoxicidade, para isso tornou-se indispensável o controle dos parâmetros da reação com o maior rigor possível, nomeadamente as concentrações dos reagentes, a temperatura e o volume de síntese.

Na **Figura 10** são apresentadas as fotografias representativas das etapas de produção de $\text{Ni(OH)}_2\text{-Cl}$ e NiO-Cl . Esta metodologia apresentou boa reprodutibilidade e capacidade para ser realizada em escalas industriais.

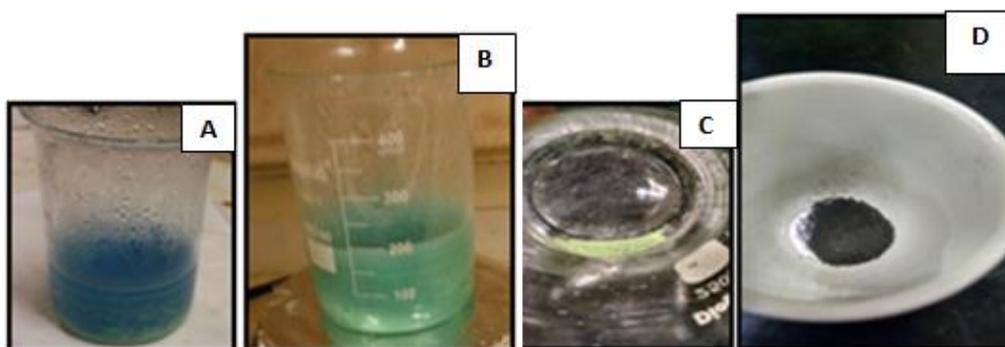


Figura 10. Fotografias representativas das etapas de síntese de NiO-Cl (óxido de níquel produzido a partir de cloreto de níquel (II), anidro). A) aquecimento da mistura reacional e adição de água; B) precipitação de hidróxido de níquel; C) hidróxido de níquel seco a 100°C e D) NiO-Cl calcinado a 410°C

Na produção do $\text{Ni(OH)}_2\text{-Et}$ o resultado da reação foi um sol-gel, onde o processo de hidrólise conduziu a um gel de elevada pureza em um curto espaço de tempo. Por conseguinte, a cinética de formação do gel pode ser afetada por muitas variáveis. Por exemplo, escolha de solvente, temperatura, concentração, o sal de níquel e, também o tratamento térmico. Obtivemos melhor resultado com o NiCl_2 na forma hidratada que na forma anidra. Isso reflete, o fato de que estes sais podem ser solubilizados em solventes como o álcool (**Figura 11**).

Depois de escolher as melhores condições de síntese, a fim de obter nanopartículas com diâmetros de 3 a 5 nm, obtivemos nanopartículas de NiO-Et com diâmetro maiores do que o desejado e baixa área superficial quando comparada ao valor de área superficial encontrado ($375 \text{ m}^2/\text{g}$) por CARNES *et al.*, (2002). Possivelmente, esses fatos estão relacionados com as condições que realizamos a síntese. Por exemplo, o tratamento térmico do hidróxido para a produção das nanopartículas de NiO-Et ocorreu a $410 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h e não aquecido a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, como descrito pelo referido autor.

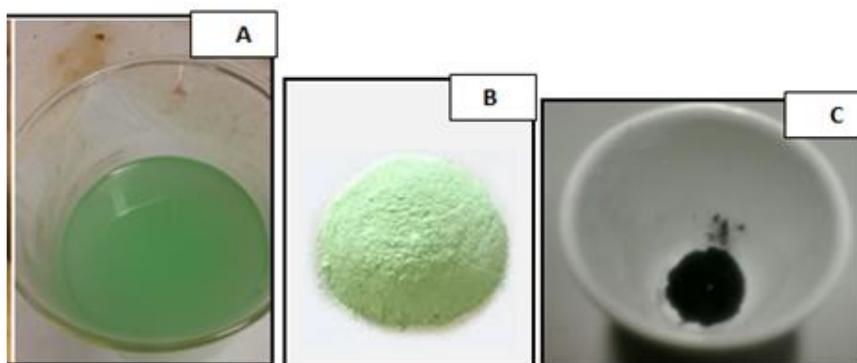


Figura 11. Fotografias representativas das etapas realizadas na síntese NiO-Et (óxido de níquel produzido a partir de cloreto de níquel (II) hexahidratado em etanol). A) mistura reacional de cloreto de níquel (II) hexahidratado, hidróxido de sódio e etanol; B) hidróxido de níquel seco a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e C) NiO-Et calcinado a $410 \text{ }^\circ\text{C}$.

Já na obtenção NiO-OAc (uso de acetato como precursor metálico) a reação foi processada em estado sólido, pois, nesse caso, há vantagens como: (1) a não utilização de solvente; (2) alto rendimento; (3) baixo consumo de energia e (4) a tecnologia de reação demonstrou ser simples. Na **Figura 12** são mostradas as fotografias das etapas envolvidas na síntese de NiO-OAc.

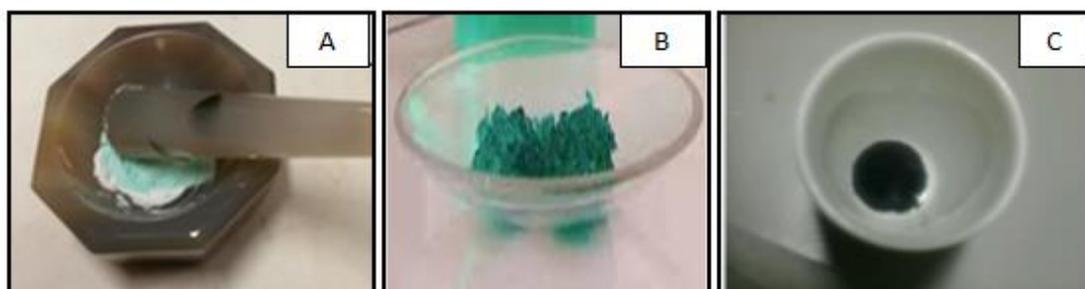


Figura 12. Fotografias representativas das etapas realizadas na síntese NiO-OAc (óxido de níquel produzido a partir de acetato de níquel (II) tetrahidratado). A) mistura reacional de acetato de níquel (II) tetrahidratado e hidróxido de sódio; B) hidróxido de níquel seco a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e C) NiO-OAc calcinado a $410 \text{ }^\circ\text{C}$.

Antes de se iniciarem os ensaios de citotoxicidade com as NiO-NPs, avaliou-se a sua estabilidade, estado de agregação, morfologia e características físico-químicas. A seguir será apresentada a caracterização dos nanopartículas de óxido de níquel obtidas.

5.2. Caracterização física e química das nanopartículas de óxido de níquel

5.2.1. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica possibilitou o estudo da estabilidade térmica das formulações, bem como as temperaturas iniciais de decomposição. Ademais, foi possível quantificar o percentual de perda de massa nas etapas de degradação do material.

As curvas TG e suas derivadas (DTG) das formulações Ni(OH)₂-Cl e Ni(OH)₂-Et, apresentaram eventos térmicos similares. Já a formulação NiO-OAc apresentou perfil de decomposição diferente das demais. Por meio da análise das curvas TG e DTG verificou-se três etapas de perda de massa na faixa de temperatura analisada (25 a 1000 °C) para Ni(OH)₂-Cl e Ni(OH)₂-Et, conforme mostrado na **Figura 13 (A e B)**. Estes achados estão de acordo com estudos realizado por MOHAMMADIJOO *et al.* (2014). Em contrapartida, foram identificadas quatro etapas de perda de massa para a formulação Ni(OH)₂-OAc (**Figura 13 C**).

Em relação à primeira etapa, considerando a composição Ni(OH)₂-Cl, ocorreu uma perda de aproximadamente 9% de massa na faixa de temperatura entre 42 a 235 °C (**Figura 13 A**). Este comportamento termogravimétrico foi semelhante ao da composição Ni(OH)₂-Et (**Figura 13 B**), que está na faixa de 39 a 229 °C, estando relacionada à presença de água cristalina e umidade nos poros liberados ao longo deste intervalo de temperatura.

Considerando a composição Ni(OH)₂-OAc, notou-se duas etapas de perda de massa em intervalos próximos, na faixa de 39 a 235 °C sendo cerca de 12%. Estas perdas, registradas para essa formulação, assim como para as

demais formulações, pode ser existência de água adsorvida mas também é possível observar que o perfil da inclinação da curva é diferente das composições $\text{Ni(OH)}_2\text{-Cl}$ e $\text{Ni(OH)}_2\text{-Et}$. Isto pode ter sido ocasionado devido a perda do íon acetato proveniente do precursor metálico ($\text{Ni(C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), que pode ter ficado retido no espaço interlamelar, na forma de CO_2 e ainda pode ser indicativo de resíduos de tween que não foi completamente removido durante a lavagem e secagem. Estes achados são similares aos relatados por WANG *et al.*, (2005) que também usou acetato de níquel como precursor metálico e Tween (**Figura 13 C**).

Na segunda etapa, devido a decomposição de Ni(OH)_2 em decorrência da perda de água estrutural, a perda de massa está faixa de 10 - 14% para $\text{Ni(OH)}_2\text{-Cl}$ e para $\text{Ni(OH)}_2\text{-Et}$ e isto ocorreu entre 250 a 285 °C e 253 a 293 °C, respectivamente. Por outro lado, para $\text{Ni(OH)}_2\text{-OAc}$ em uma terceira etapa verificou-se que a perda de massa ocorreu aproximadamente a 279 °C. Estes achados estão de acordo com estudos realizados por DENG & CHEN (2004).

Finalmente, a terceira etapa para as formulações NiO-Cl e NiO-Et e quarta etapa para NiO-OAc está relacionada, provavelmente com a produção de NiO-NPs que ocorreu acima de 380 °C para as três formulações que foi também observado por MOHAMMADIJOO *et al.*, (2014), WANG *et al.*, (2005) e DENG & CHEN (2004) estes autores empregaram as mesmas metodologias de síntese das nossas formulações.

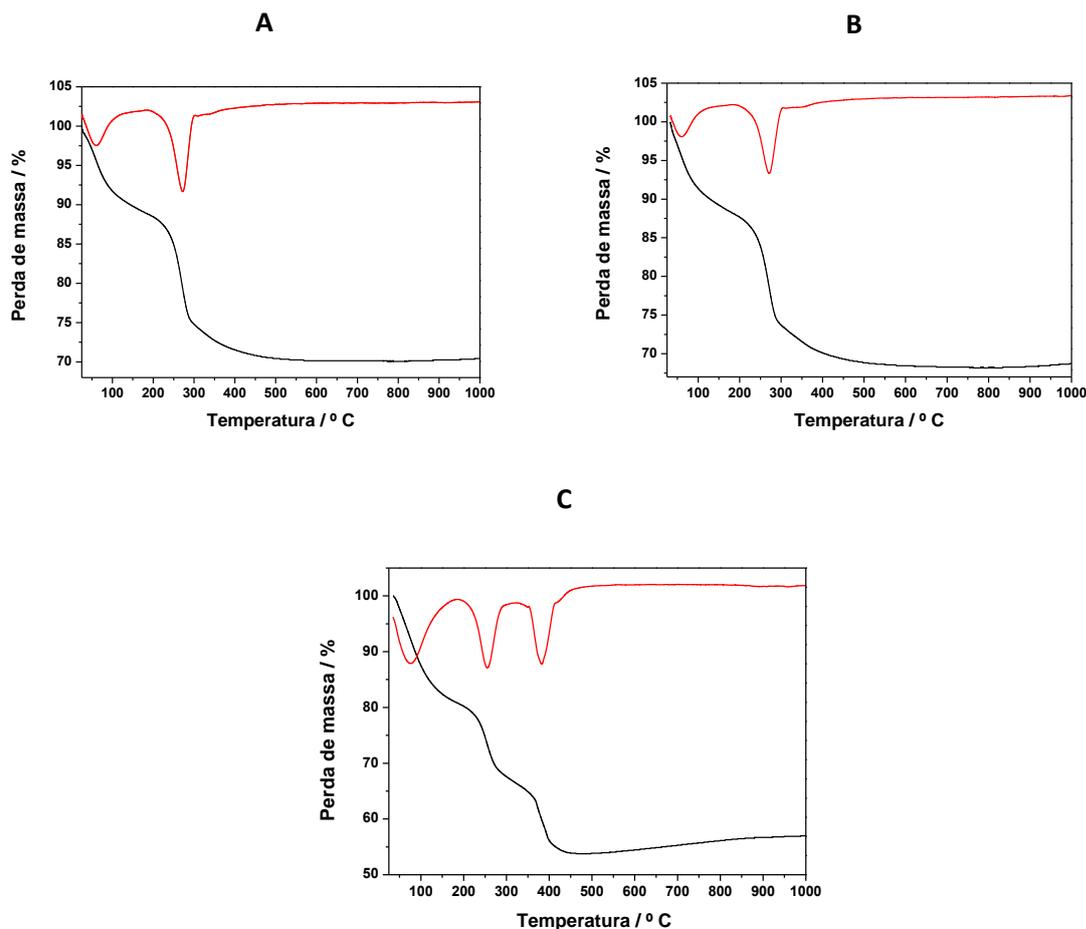


Figura 13. Curvas termogravimétricas (TG-----) e suas derivadas (DTG-----) de hidróxido de níquel. A) $\text{Ni}(\text{OH})_2\text{-Cl}$; B) $\text{Ni}(\text{OH})_2\text{-Et}$ e C) $\text{Ni}(\text{OH})_2\text{-OAc}$ obtidas em atmosfera de N_2 .

5.2.2. Caracterização por Difração de Raios-X

A caracterização estrutural de um material está intimamente relacionada com as propriedades do mesmo. Os materiais metálicos são predominantemente cristalinos e na caracterização de suas estruturas interessa determinar fases presentes, contornos de grãos e defeitos cristalinos. A estrutura cristalina do óxido de níquel é um sistema similar ao cloreto de sódio (NaCl), do tipo *Bunsenite*, onde os ânions oxigênio estão organizados em uma geometria cúbica de face centrada, sendo que os cátions de níquel ocupam posições intersticiais em coordenação octaédrica. Porém, a estrutura do óxido de níquel sofre uma pequena distorção devido ao maior comprimento do raio iônico do níquel em relação ao sítio octaédrico, resultando em uma rede,

cujos ângulos assumem valores de $90^{\circ}4'$ ao invés de 90° (DHARMARAJ, 2006).

Com os dados obtidos pelo difratograma das nanopartículas foi possível, identificar a fase cristalina e o diâmetro médio das composições analisadas. Todos estes picos característicos de difração (111), (200), (220), (311) e (222) podem ser perfeitamente indexados para a estrutura cúbica de NiO. Isto foi confirmada pela identificação do método do pó com os picos registrado no programa *Pmgr* (Shimadzu), que permite o acesso ao banco de dados da *JCPDF* (International Centre for Diffraction Data) carta n° 4-0835.

Por meio da análise dos difratogramas de raios - X das formulações calcinados a 410°C sugere-se que as composições apresentaram picos característicos de óxido de níquel. Adicionalmente, observou-se a formação de pós cristalinos sem picos relativos à impureza (**Figura 14 A, B e C**).

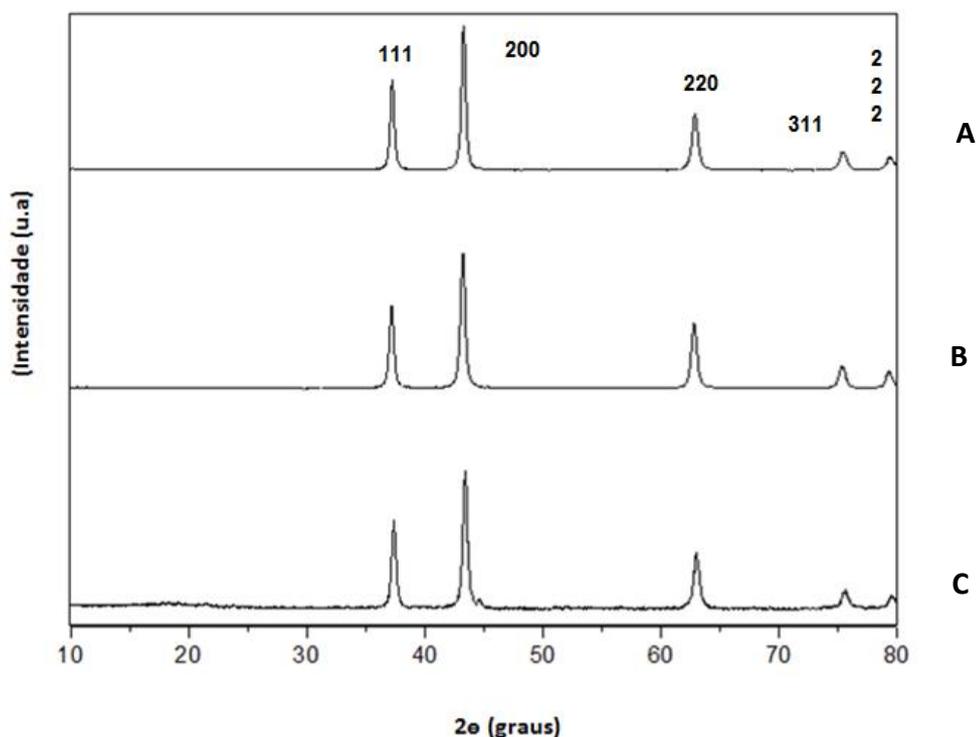


Figura 14. Difratogramas de nanopartículas de NiO calcinado a 410°C para nanopartículas das sínteses. A) NiO-Cl; B) NiO-Et e C) NiO-OAc.

A partir dos dados observados no padrão de DRX foi possível calcular o tamanho médio dos domínios cristalinos por meio da *equação de Scherrer* (**equação II, Apêndice A**) e obteve-se os seguintes valores de diâmetro dos cristalitos 13,07 nm ($\pm 2,12$) para de NiO-Cl, 19,78 nm ($\pm 1,05$) para NiO-Et e 21,10 nm ($\pm 1,30$) para NiO-OAc. Estes valores evidenciam que as composições sintetizadas, de fato, apresentam tamanho nanométrico e, ainda, o valor obtido para a formulação NiO-Cl é similar ao encontrado por MOHAMMADIJOO *et al.*, (2014). Já para a formulação NiO-Et e NiO-OAc foram diferentes dos diâmetros obtidos por CARNES *et al.*, (2002) e WANG *et al.*, (2005) respectivamente, que descreveram valores menores do que foi encontrado no nosso trabalho. Isso possivelmente está relacionado com as adaptações que fizemos para obtenção das NiO-NPs que resultaram em partículas maiores para as formulações NiO-Et e NiO-OAc do que àquelas obtidas por esses autores.

5.2.3. Análise textural das nanopartículas

Neste trabalho foi utilizado um método bastante referenciado para o cálculo de área superficial (modelos Brunauer, Emmet e Teller). Tanto o perfil das isotermas quanto o da histerese (resultado da diferença da condensação e evaporação do gás adsorvido) fornecem informações a respeito da textura do sólido. O diâmetro e o volume de poros foram determinados utilizando-se modelo de Barret-Joyner-Halenda (BJH) que foi aplicado às curvas de dessorção. Por meio da análise destes resultados verificou-se que as formulações, NiO-Et, NiO-Cl e NiO-OAc, calcinadas a 410 °C, apresentaram histerese do tipo III (**Figuras 15 A, B e C**). Nesse tipo de histerese, os poros apresentam formato de cunhas, cones e/ou placas paralelas, de acordo com a classificação do BDDT (GREGG & SING, 1982).

Isotermas do tipo III caracterizam-se quando o calor de adsorção entre as moléculas adsorventes é menor do que o calor de liquefação. Assim, as moléculas do gás adsorvido têm maior afinidade umas com as outras do que com a superfície do sólido, prejudicando a análise de área superficial e da porosidade.

A curva histerese da formulação NiO-OAc foi maior quando comparada às outras duas composições e isso pode indicar que houve uma obstrução dos poros devido ao carbono residual preso ao material precursor ($\text{Ni}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Essa dificuldade de acesso de gás aos sítios de adsorção pode reduzir os valores de área específica do material (BECK,1992).

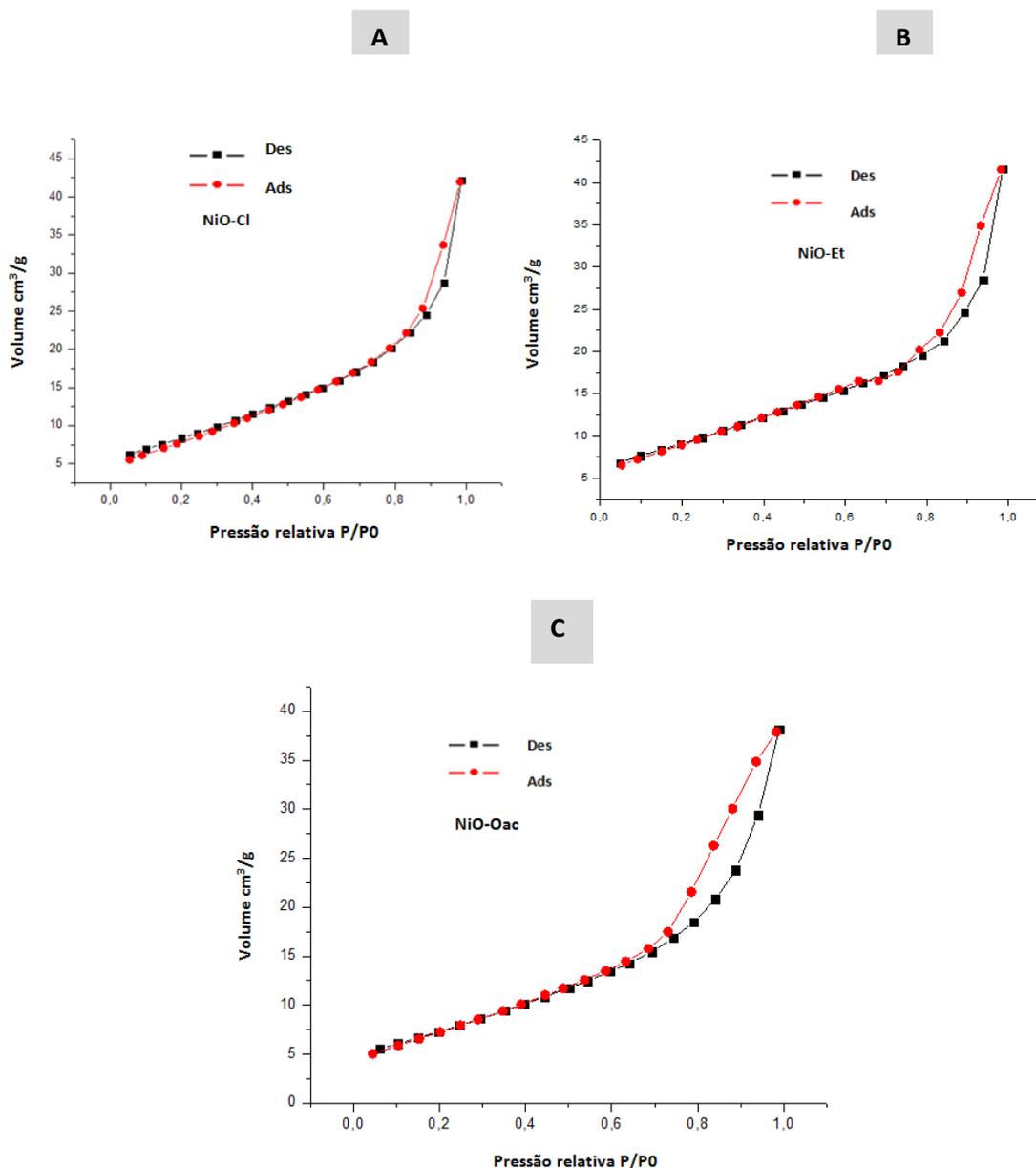


Figura 15. Isothermas de adsorção e dessorção de nanopartículas de óxido de níquel. A) NiO-Cl; B) NiO-Et e C) NiO-OAc. **Des:** Dessorção; **Ads:** Adsorção

Para as três composições estudadas observou-se que, para baixos valores de pressão relativa (P/P_0), o volume de gás adsorvido não se inicia do zero. A presença de mesoporos pode ser constatada pelo brusco aumento no volume de gás adsorvido em pequenas pressões relativas (**Figura 15**).

Os resultados desta análise foram sumarizados na **Tabela 1**. Foi constatado que as NPs-NiO produzidas a 410 °C (Cl, Et e OAc) apresentaram área superficial abaixo do encontrado por MOHAMMADIJOO *et al.*, (2014) e CARNES *et al.*, (2002) que estimaram a área superficial de NiO-Cl e NiO-Et respectivamente de 70 m²/g e 60 m²/g. Em contrapartida encontramos, em nosso estudo, áreas de 33 m²/g para NiO-Cl e 31 m²/g para o NiO-Et, utilizando a mesma metodologia sugerida para NiO-Cl e com algumas adaptações para a metodologia de síntese de NiO-Et, conforme seção de **Materiais e Métodos, item 4.2.2**. Já para o NiO-OAc a metodologia utilizada não faz referência ao valor de área superficial, sendo que o valor encontrado neste estudo foi de 27 m²/g. Contudo, esta diferença de valores entre os nossos achados e do grupo de MOHAMMADIJOO *et al.*, (2014) e CARNES *et al.*, (2002) pode ter ocorrido porque estes analisaram partículas com tamanho médios menores (3 – 10 nm) do que àquelas utilizadas em nosso estudo, pois a redução no tamanho implica em um aumento na área superficial.

Tabela 1. Área de superfície específica, volume de poros e diâmetros de poros de NiO-NPs calcinadas a 410 °C.

	Nanopartículas		
	NiO-Cl	NiO-Et	NiO-OAc
Área superficial (m ² /g)	33	31	27
Volume de poro (cm ³ /g)	0,056	0,059	0,55
Diâmetro de poro (nm)	3,2	3,4	8,8

Os volumes de poro e diâmetros de poros foram analisados e mostraram ser similares entre as formulações NiO-Cl e NiO-Et (menores que 4 nm) enquanto que, para a formulação NiO-OAc observou-se diâmetro de poro maior (8,8 nm). Todavia, as composições foram caracterizadas por ter mesoporos (poros de diâmetros entre 2 e 50 nm) de acordo com a classificação de SING (2009).

5.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão e Energia Dispersiva de Raios-X

As imagens obtidas por MET foram analisadas no programa de análise de imagem denominado "*ImageJ*", usado para a contagem de nanopartículas e avaliação dos seus diâmetros. As formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc, obtidas, apresentaram características polimórficas, incluindo predominantemente a forma esférica. Contudo, foi possível observar também estruturas elipsóides, hexagonais e cúbicas. Além disso, observou-se nanopartículas aglomeradas, aspecto relacionado à distribuição polidispersa das nanopartículas, conforme será apresentado nas **Figuras 16, 17 e 18 (A)**.

O diâmetro modal de uma população de nanopartículas consiste no valor de diâmetro que ocorre com maior frequência. No gráfico de distribuição de frequência de diâmetros, corresponde ao pico. Quando essa população de nanopartículas apresenta valores de diâmetro que possuem uma distribuição simétrica, o diâmetro modal terá um valor muito próximo daquele do diâmetro médio (média aritmética de todos os valores de diâmetro). Por outro lado, se a distribuição é assimétrica, ou seja, se existe uma subpopulação com muitas partículas muito pequenas ou muito grandes, esta "impulsiona" o diâmetro médio para a esquerda ou para a direita respectivamente, e assim este parâmetro (diâmetro médio) passa a não ser uma medida adequada para se caracterizar a população de nanopartículas. Neste caso, o diâmetro modal representa melhor esta população.

Com relação ao diâmetro modal, das nanopartículas de NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc apresentaram diâmetro modal de 17 nm ($\pm 0,19$); 29 nm ($\pm 0,42$)

e 27 nm ($\pm 0,45$), respectivamente, de acordo com o histograma com a distribuição de tamanhos **Figura 16, 17 e 18 (B)**. Esses valores são maiores que àqueles de 5 nm encontrados CARNES *et al.*, (2002) e 10 nm WANG *et al.* (2005) e (5 nm) para as mesmas metodologias de sínteses para obtenção das formulações NiO-Et e NiO-OAc respectivamente. Já o valor encontrado no nosso trabalho para a formulação NiO-Cl de 17 nm corrobora com estudos realizados por MOHAMMADIJOO *et al.*, (2014) que mencionou diâmetros na faixa de 15 – 20 nm.

Os resultados dos espectros por (EDS) de acordo com as **Figuras 16, 17 e 18 (C)** nos permitiu identificar os elementos químicos que compõem o ponto analisado nas formulações **Figuras 16, 17 e 18 (D)**. Devido a topografia irregular das formulações, o que impediu uma análise quantitativa precisa, todos os espectros obtidos são referentes a um caráter puramente qualitativo. Observou-se a presença de um sinal intenso de EDS para as linhas espectrais de níquel e oxigênio, indicando esses elementos como constituintes principais das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc. No entanto observou-se linhas espectrais para o cobre (Cu) e carbono (C). Pois as telas em que são colocadas as formulações para as análises são de cobre e recobertas com carbono (C) por isto estes dois elementos foram observados em nossas análises.

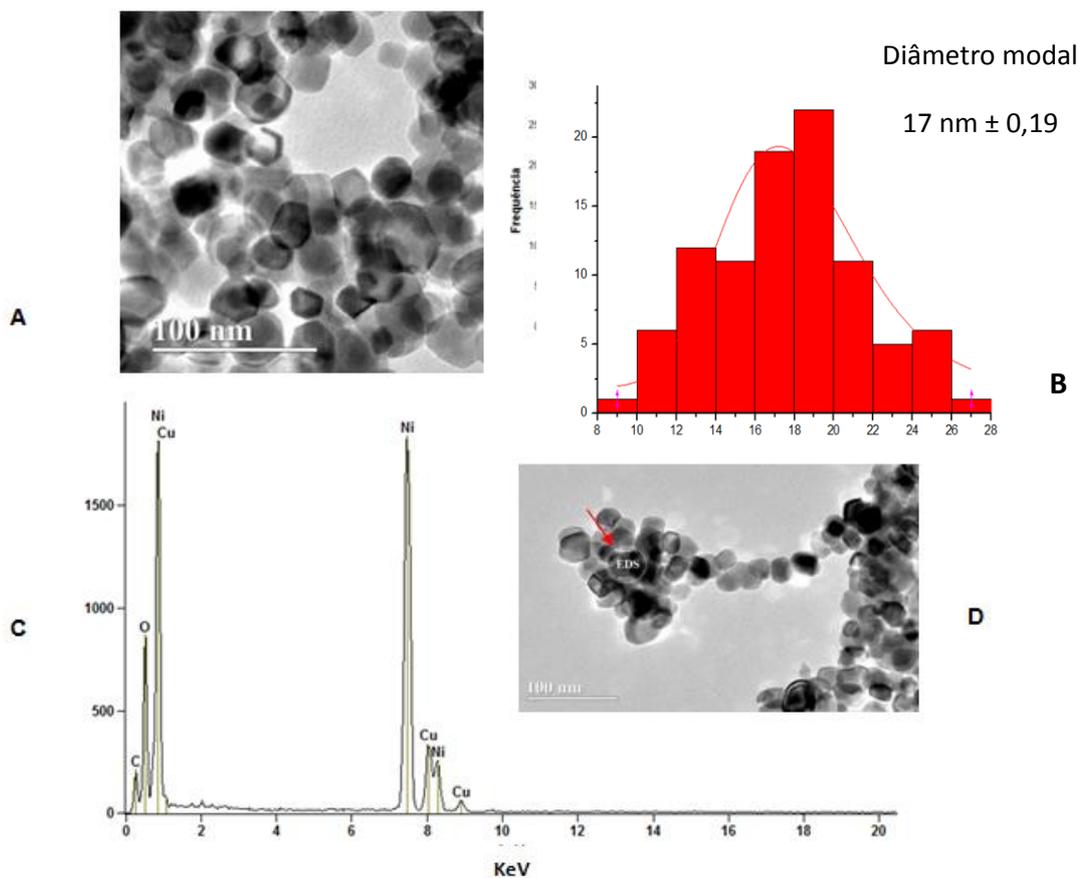


Figura 16. Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-CI) por microscopia eletrônica de transmissão no aumento de 200 kV. (A) Micrografia eletrônica transmissão de nanopartículas de NiO-CI; (B) Histograma de NiO-CI; (C) Espectro de EDS e (D) Posição e identificação do ponto analisado na micrografia eletrônica transmissão de nanopartículas.

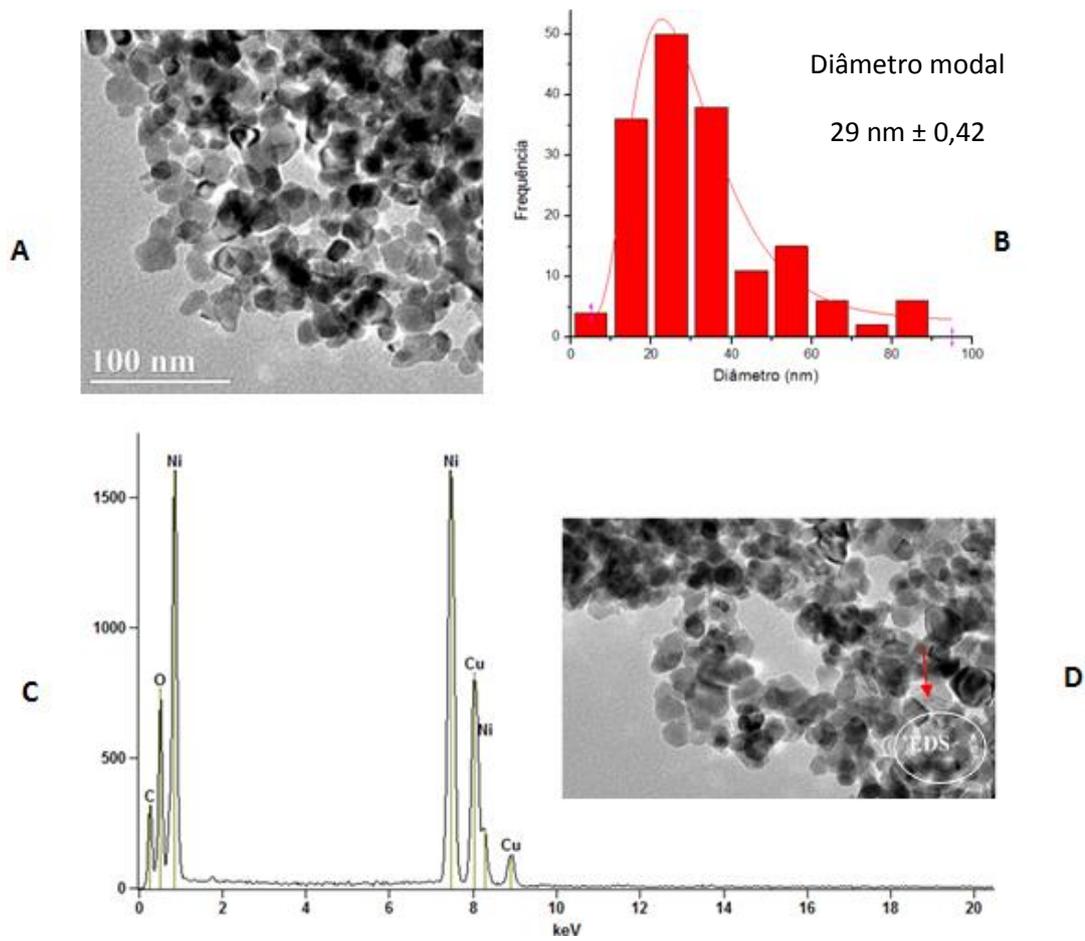


Figura 17. Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-Et) por microscopia eletrônica de transmissão no aumento de 200 kV. (A) Micrografia eletrônica transmissão de nanopartículas de NiO-Et; (B) Histograma de NiO-Et; (C) Espectro de EDS e (D) Posição e identificação do ponto analisado na micrografia eletrônica transmissão de nanopartículas.

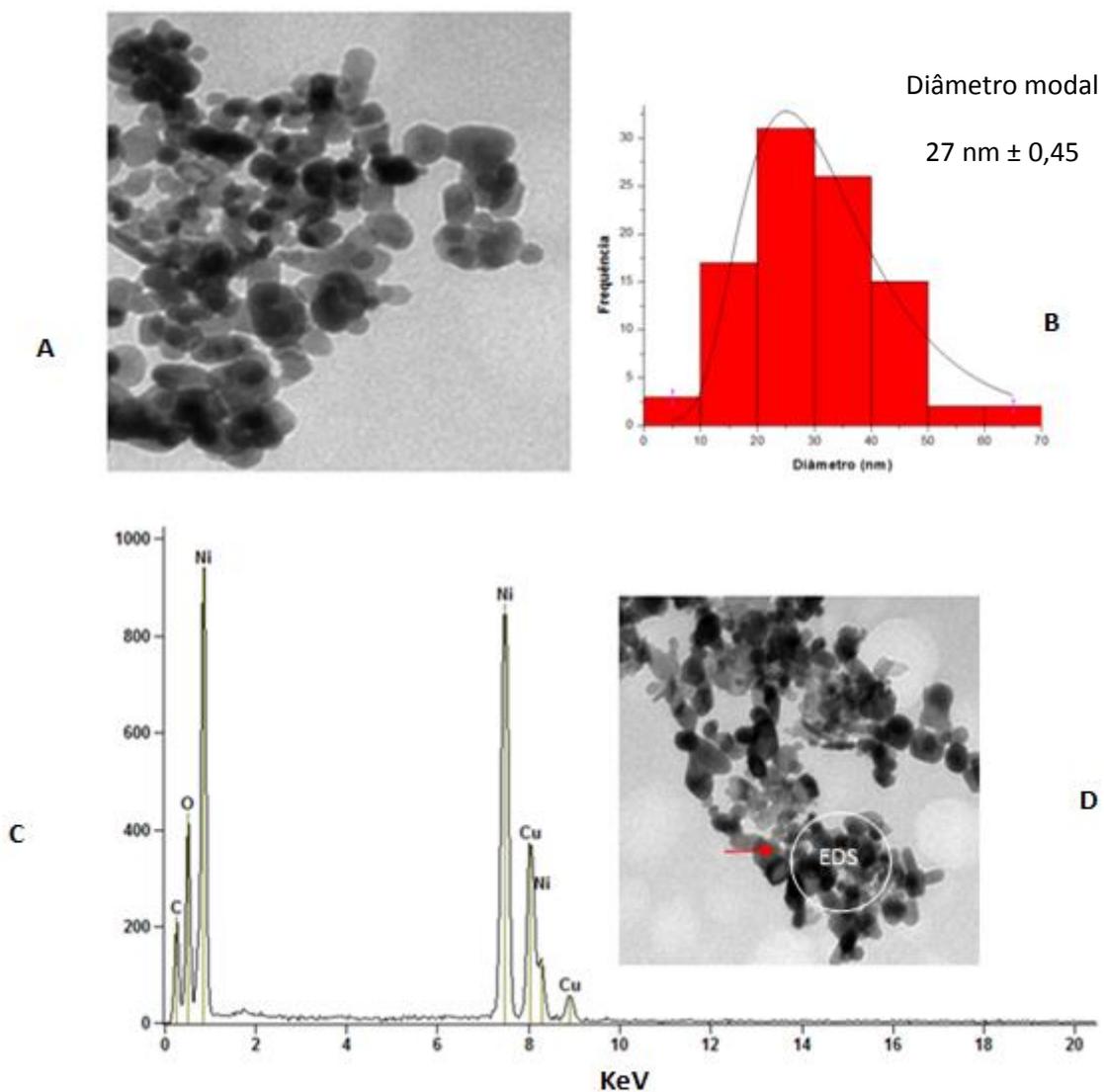


Figura 18. Caracterização morfológica e mensuração de nanopartículas de óxido de níquel (NiO-OAc) por microscopia eletrônica de transmissão no aumento de 200 kV. (A) Micrografia eletrônica transmissão de nanopartículas de NiO-OAc; (B) Histograma de NiO-OAc; (C) Espectro de EDS e (D) posição e identificação do ponto analisado na micrografia eletrônica transmissão de nanopartículas.

5.2.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Por meio da análise de espectros de infravermelho (**Figura 19**) das formulações de nanopartículas obtidas após o tratamento térmico a 410 °C, verificou-se a presença de bandas em aproximadamente 475 cm^{-1} , 427 cm^{-1} e 490 cm^{-1} para NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc, respectivamente. Nós atribuímos estes picos ao alongamento de ligação Ni-O, que indica formação dessas nanopartículas de óxido de níquel após o tratamento térmico a 410 °C, o que está de acordo com resultados encontrado por PATIL *et al.*, (2011).

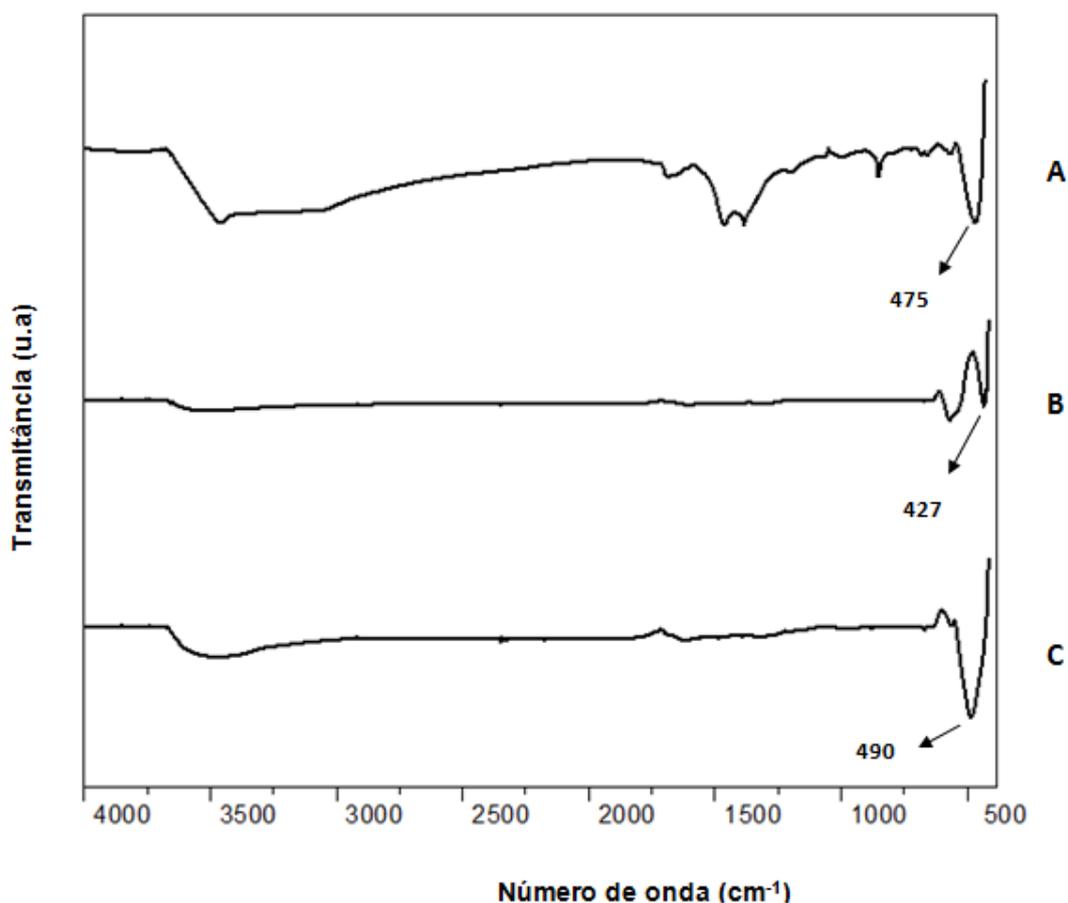


Figura 19. Espectro de infravermelho para nanopartículas de óxido de níquel de sínteses distintas A) NiO-Cl; B) NiO-Et e C) NiO-OAc) na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

5.3. Estabilidade das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc

As suspensões preparadas apresentaram diferentes aspectos visuais entre si, o que, possivelmente, está associado aos produtos de NiO formado. Isto é, sendo o produto estequiométrico, a relação Ni:O (1:1) apresenta-se na coloração esverdeada **Figura 20 (B)** e, se o produto não for estequiométrico a coloração do óxido formado é preta, como mostrado na **Figura 20 (A e C)**.

Sabendo-se que, ao longo do tempo, podem ocorrer modificações das características das NiO-NPs, nomeadamente a possibilidade de formação de agregados, o que poderia influenciar os resultados. A avaliação da estabilidade das AuNPs no período necessário para a realização dos ensaios de citotoxicidade, foi realizada.

As suspensões não apresentaram a mesma estabilidade de 21 dias, conforme foi descrito por Endoh & Uchida (2008), exceto a formulação NiO-Et que manteve uma boa estabilidade, enquanto que NiO-Cl e NiO-OAc apresentaram uma variação nos parâmetros referentes a estabilidade, no período analisado.

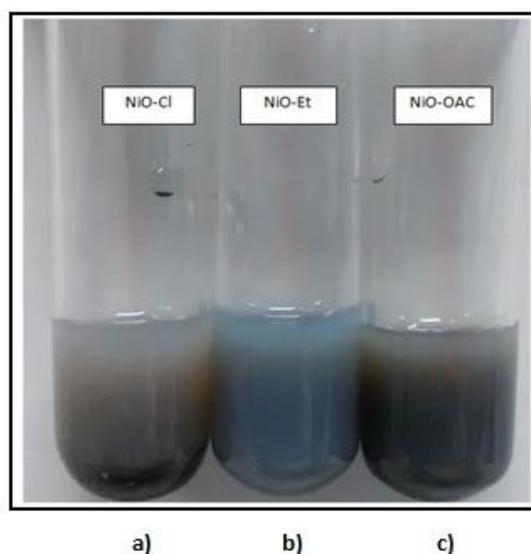


Figura 20. Suspensões de nanopartículas de óxido de níquel dispersas em água ultrapura. A) NiO-Cl ; B) NiO-Et e C) NiO-OAc .

Quando são efetuadas medições por DLS, se as suspensões coloidais de NPs apresentarem agregação das mesmas, esta técnica permite constatá-la de forma muito eficaz. Foi verificado, pelos resultados de DLS, que as NPs aumentavam os valores de dispersão da luz, sinal de ocorrência de agregação exceto a formulação NiO-Et. Adicionalmente a verificação do pH é muito importante, na perspectiva da aplicação destas NPs nos ensaios de citotoxicidade, dado que o pH fisiológico é 7. Na **Tabela 2** estão apresentados os resultados de cada parâmetro avaliado das suspensões de NiO-NPs (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) no 7° e 15° dias após a preparação.

Tabela 2: Diâmetro Hidrodinâmico médio (DH, nm), Índice de Polidispersão (PDI), Potencial Zeta (PZ, mV) e Potencial hidrogeniônico (pH) das NiO-NPs.

Período Analisado:			
7° dia após a preparação das formulações			
Formulações	NiO-Cl	NiO-Et	NiO-OAc
DH	309 ± 0,20	134 ± 1,57	406 ± 16,7
PDI	0,386 ± 0,05	0,151 ± 0,02	0,187 ± 0,16
PZ	-26 ± 0,02	+31 ± 0,08	+26 ± 0,08
pH	8	8	7
Período Analisado:			
15° dias após a preparação das formulações			
Formulações	NiO-Cl	NiO-Et	NiO-OAc
DH	342 ± 9,181	138 ± 27,39	542 ± 1,96
PDI	0,409 ± 0,08	0,160 ± 0,01	0,609 ± 0,12
PZ	-22 ± 0,03	+31 ± 0,02	+20 ± 0,03
pH	8	8	8

Os valores são referentes à média de três medidas ± desvio padrão.

A medida de potencial zeta é um referencial que verifica as condições de estabilidade da suspensão. Partículas em suspensão podem sofrer ionização ou adsorver grupos carregados em sua superfície. Assim, valores de potencial zeta abaixo de - 30 mV ou acima + 30 mV são indicativos de estabilidade do estado de dispersão das NPs em decorrência da repulsão pelas cargas elétricas da superfície das nanopartículas. Já valores entre - 30 e + 30 mV indicam instabilidade da suspensão das NPs, o que pode sugerir tendência das NPs à agregação. Portanto a partir desses resultados infere-se que, somente a

formulação NiO-Et manteve-se estável o potencial zeta não variou no período de 7 e 15 dias ($+31 \pm 0,08$; $+31 \pm 0,02$), respectivamente (MALVERN, 2004).

De acordo com a análise de potencial zeta as amostras de nanopartículas de óxido de níquel demonstraram estar sujeitas a sofrer agregação, o que pode justificar o fato de termos encontrado partículas maiores nas análises de microscopia eletrônica de transmissão quando comparado a outros trabalhos que realizaram sínteses similares. (Figura 21).

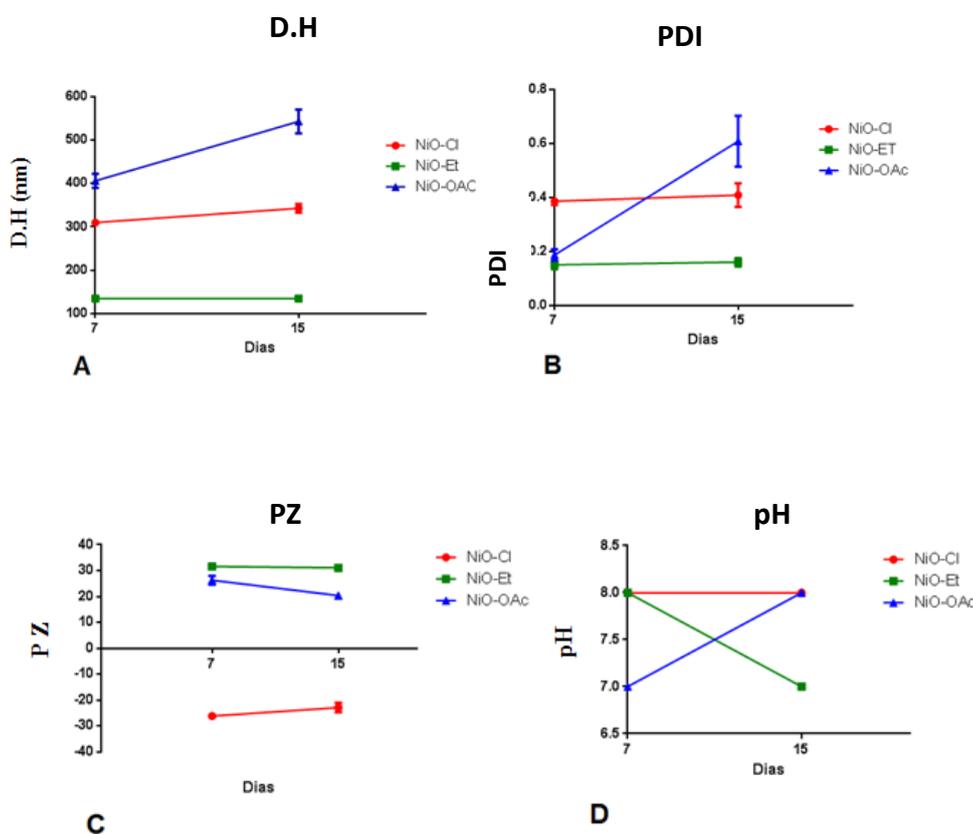


Figura 21. Parâmetros utilizados para o estudo de estabilidade das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc. (A) DH; (B) PDI; (C) PZ; e (D) pH.

5.3.1. Espectroscopia por Absorção Atômica

A concentração de níquel nas formulações das nanopartículas NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc esperada pelo método de acordo com ENDOH & UCHIDA, (2008) era de 1,1 g/L. Visto que, com o auxílio da medida de absorção atômica, as formulações apresentaram as concentrações de 0,81 g/L, 0,63 g/L e 0,79

g/L para NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc, respectivamente, isto sugere perda de massa das formulações após o processo de filtração.

5.4. Considerações gerais sobre a caracterização das formulações

Quando comparados os valores dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS com os valores determinados a partir das imagens de MET e DRX verificou-se que há uma diferença entre os respectivos valores (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores de diâmetro hidrodinâmico de distribuição de números de partículas obtidos por Espalhamento de Dinâmico Luz, diâmetro modal obtido por Microscopia Eletrônica de Transmissão, e diâmetro de cristalitos por meio de Difração de Raios-X para as três formulações das nanopartículas de óxido de níquel utilizadas neste trabalho.

Formulações	(DRX)	(MET)	(DLS)
NiO-Cl	13 nm	17 nm	325 nm
NiO-Et	19 nm	29 nm	136 nm
NiO-OAc	21 nm	27 nm	474 nm

Normalmente, os valores de diâmetros obtidos por DLS são superiores ao diâmetro determinado por MET e também pelo diâmetro obtido por DRX. Isto pode ser atribuído ao fato da técnica de DLS medir o diâmetro das partículas, que inclui necessariamente o raio da esfera de hidratação. Além disso, as medições de DLS são muito sensíveis à agregação, mesmo para agregados de pequena dimensão, e nossas partículas apresentaram-se aglomeradas, conforme as análises realizadas por MET.

Assim, a existência de agregados pode desviar toda a população de tamanhos para valores um pouco maiores. Já o diâmetro mensurado por MET detecta apenas a matéria com elevada densidade eletrônica, enquanto que o DRX, de forma complementar, nos permite calcular os domínios cristalinos. Estas considerações foram confirmadas para as suspensões analisadas, em

que o diâmetro médio determinado por DLS é maior que o diâmetro determinado por MET e DRX (NATH & CHILKOTI 2001).

5.5. Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de níquel *in vitro* por ensaio colorimétrico do MTT

O ensaio colorimétrico do MTT é um dos métodos mais referenciados para avaliação da citotoxicidade de compostos e nanocompostos (HEO,1990). A avaliação da viabilidade celular por este método é bastante empregada para identificar a citotoxicidade de diversas nanopartículas.

Em nossos ensaios, as doses empregadas foram escolhidas após a análise de alguns artigos, os quais investigaram doses de 1 a 100 µg/mL em diferentes linhagens de culturas celulares. Estes estudos serão citados no decorrer da apresentação de resultados e discussão abaixo. De maneira geral, todas as formulações investigadas (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) induziram citotoxicidade, tanto em linhagens de cultura de células de fibroblastos (NIH-3T3) e de queratinócitos (HaCat) em todas as doses (10, 50 e 100 µg/mL) e tempos investigados (24, 48 e 72 h) (**Figura 22 e 29**). A seguir, os resultados sobre a citotoxicidade de cada uma das formulações, sintetizadas e caracterizadas neste estudo, serão apresentados por linhagem celular.

5.5.1. Avaliação da citotoxicidade sobre a linhagem HaCat

Além das formulações induzirem citotoxicidade em todas as doses e tempos, observou-se também que houve tendência de menor viabilidade celular da linhagem HaCat quando incubadas com doses crescentes das NiO-NPs, especialmente na dose de 100 µg/mL com a formulação de NiO-OAc (**Figura 22**).

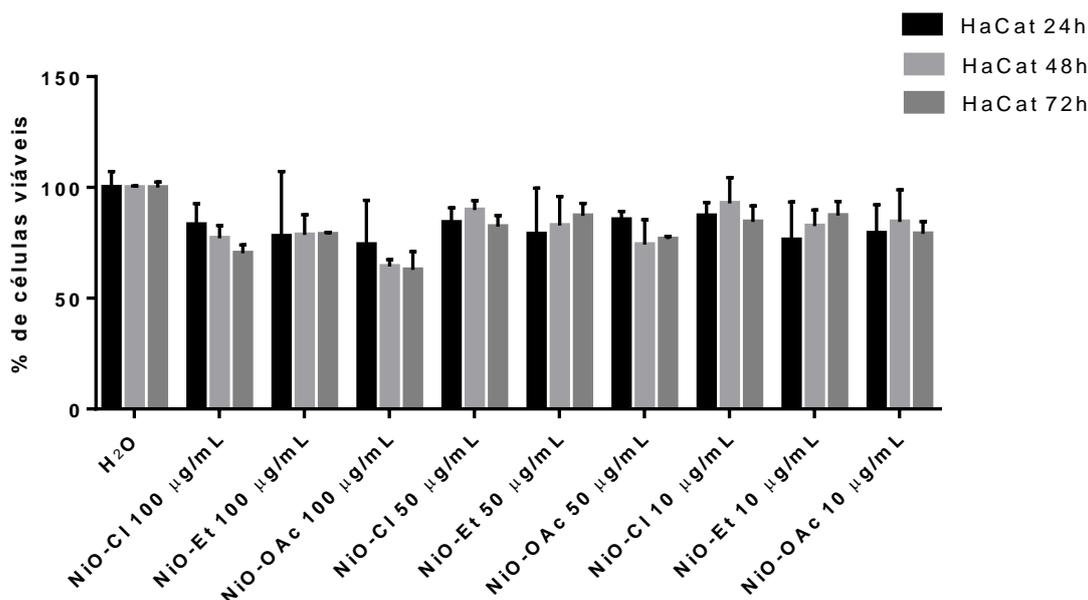


Figura 22. Distribuição da viabilidade celular segundo as doses de NiO-CI, NiO-Et e NiO-OAc na linhagem HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com doses de 10, 50, 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

A seguir, os resultados serão apresentados de forma mais detalhada a fim de se descrever o efeito de cada uma das formulações empregadas neste estudo (NiO-CI, NiO-Et e NiO-OAc) sobre a viabilidade de células HaCat em relação às doses (10, 50 e 100 µg/mL) e tempos de exposição (24, 48 e 72 h).

Com relação ao tratamento das células HaCat com a formulação NiO-CI a redução na viabilidade foi de, no máximo, 30%, haja vista que esta formulação induziu maior efeito citotóxico na dose de 100 µg/mL em 72 h (70% de células viáveis ± 3,7) (**Figura 23**).

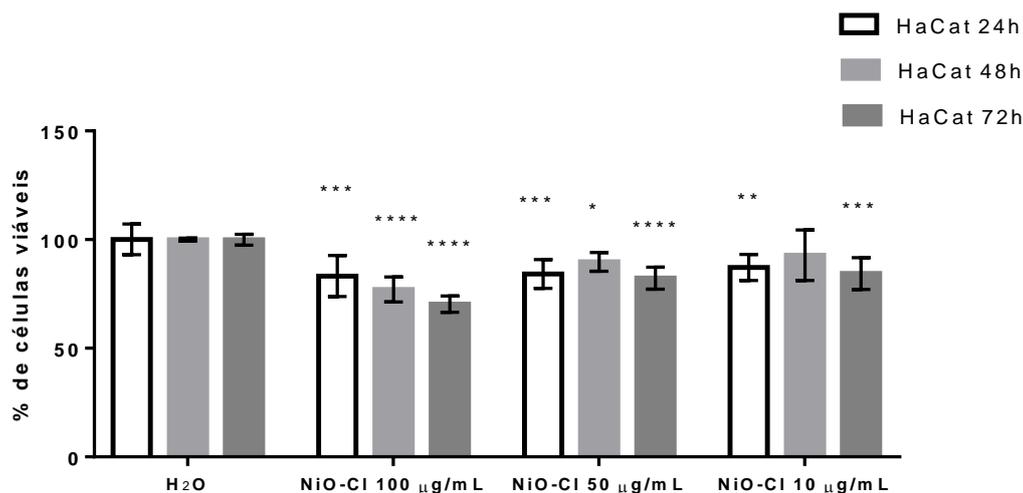


Figura 23. Distribuição da viabilidade celular segundo as doses de NiO-Cl na linhagem celular HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com 10, 50 e 100 µg / mL de NiO-Cl e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± desvio padrão de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001.

A respeito da formulação NiO-Et também se observou que esta apresentou efeito citotóxico, especialmente após o tratamento com a maior dose (100 µg/mL), após 24, 48 e 72 h. Nos demais tratamentos (doses de 10 e 50 µg/mL) houve redução significativa na viabilidade celular apenas no período de 24 h (**Figura 24**).

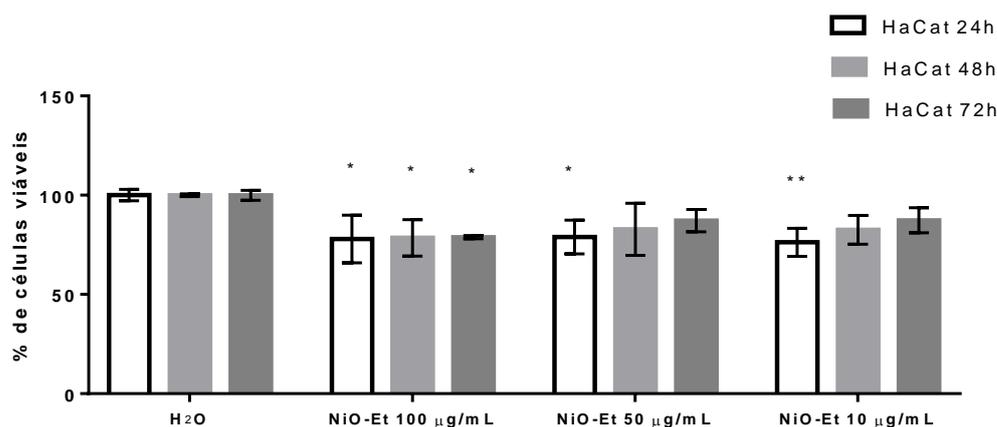


Figura 24. Distribuição da viabilidade celular em termos da concentração de nanoaprtículas de NiO-Et em linhagem celular HaCat avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células HaCat foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg / mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001.

Quanto ao tratamento com a formulação NiO-OAc também se observou redução na viabilidade das células HaCat em todas as doses e tempos investigados em relação ao grupo controle (**Figura 25**). Além disso, este efeito citotóxico foi mais pronunciado na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ e no período de 72 h. Esta formulação foi a que apresentou a menor viabilidade em células HaCat, sendo esta de 62,3% ($\pm 8,3$) em relação ao grupo controle. Sendo esta formulação a que apresentou a menor estabilidade em suspensão.

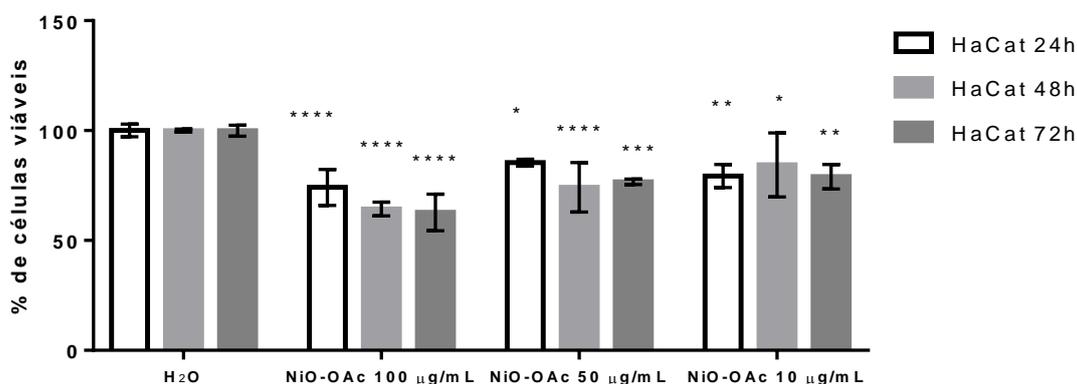


Figura 25. Distribuição da viabilidade celular segundo a dose de nanopartículas de NiO-OAc em linhagem celular *HaCat* avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células *HaCat* foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O, Médias \pm DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P \leq 0.05; ** P \leq 0.01, *** P \leq 0,001; **** P \leq 0.0001.

5.5.2. Avaliação da citotoxicidade sobre a linhagem NIH-3T3

De modo geral, observou-se que NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc induziram citotoxicidade de maneira dependente da dose e do tempo em células da linhagem NIH-3T3, assim como ocorreu com HaCat. A título de exemplo, notou-se que a citotoxicidade foi proporcionalmente maior com o aumento da dose. Além disso, em geral, o perfil de citotoxicidade das formulações investigadas foi similar (**Figuras 26 a 30**).

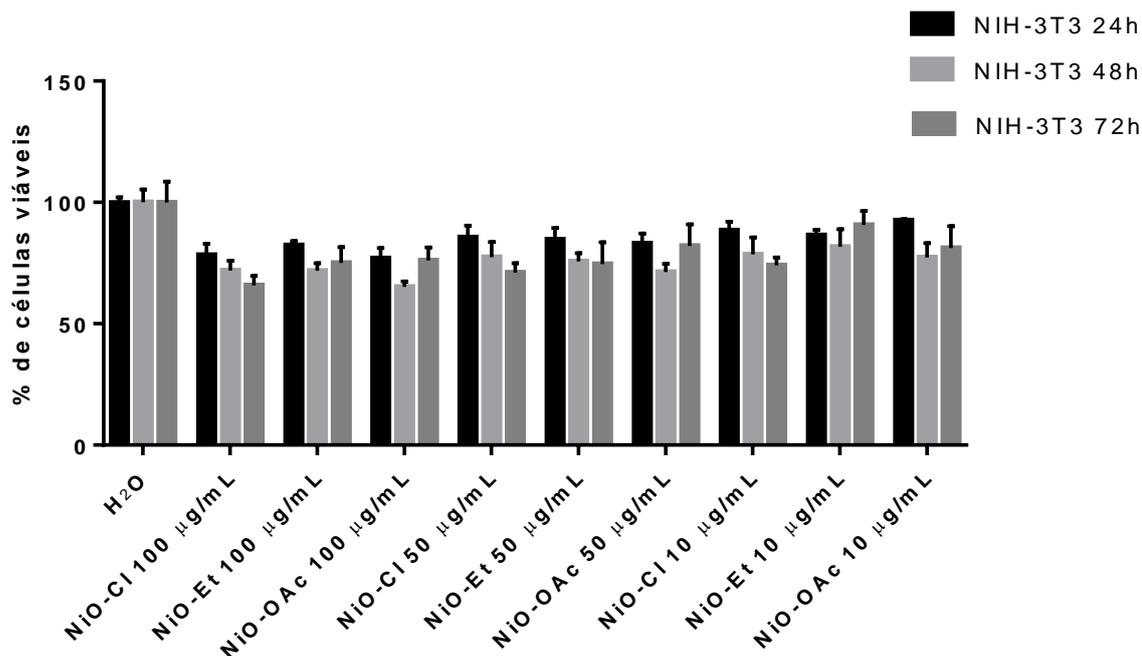


Figura 26. Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc na linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas.

Acerca dos dos tratamentos com NiO-Cl, na linhagem NIH-3T3, notou-se que esta formulação reduziu a viabilidade em todas as doses e tempos investigados, exceto na dose de 10 µg/mL no período de 48 h. Além disso, o efeito citotóxico desta formulação foi maior na dose de 100 µg/mL e no período de 72 h de tratamento, o que correspondeu a 65,8% (± 3,9) de viabilidade celular em relação ao grupo controle (**Figura 27**).

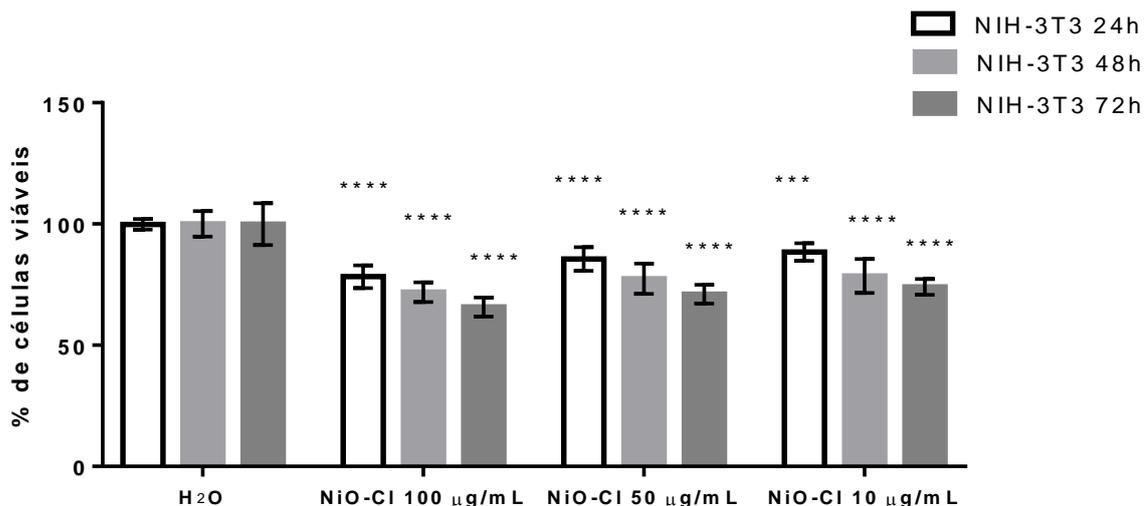


Figura 27. Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Cl em linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001.

Com referência a NiO-Et verificou-se que esta formulação também foi citotóxica para células da linhagem NIH-3T3 em todas as doses e tempos de incubação avaliados, visto que a porcentagem de viabilidade celular foi menor nos grupos de tratamentos com NiO-Et do que no grupo controle. O menor valor de viabilidade celular foi observado na dose intermediária (50 µg/mL) no tempo de 48 h (75,7 % ± 3,2) em contraste com a dose de 10 µg/mL, no período de 72 h, em que se verificou o maior valor de viabilidade celular (90% ± 5,8) (**Figura 28**).

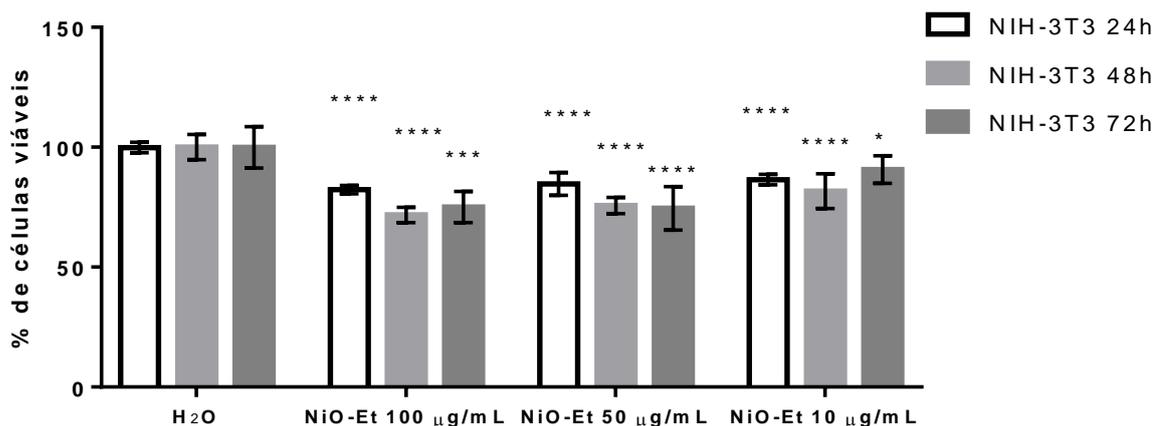


Figura 28. Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de nanopartículas de NiO-Et na linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001.

Em referência a NiO-OAc verificou-se que houve redução na viabilidade de células NIH-3T3 tratadas com as três doses e nos três períodos de exposição analisados. Ademais, este efeito foi mais acentuado na maior dose (100 µg/mL) e tempo de tratamento (48 h), apresentando cerca de 65,2% (± 2,3) de viabilidade. Desta forma, sugere-se que o NiO-OAc também induziu efeito citotóxico dependente da dose e do tempo (**Figura 29**).

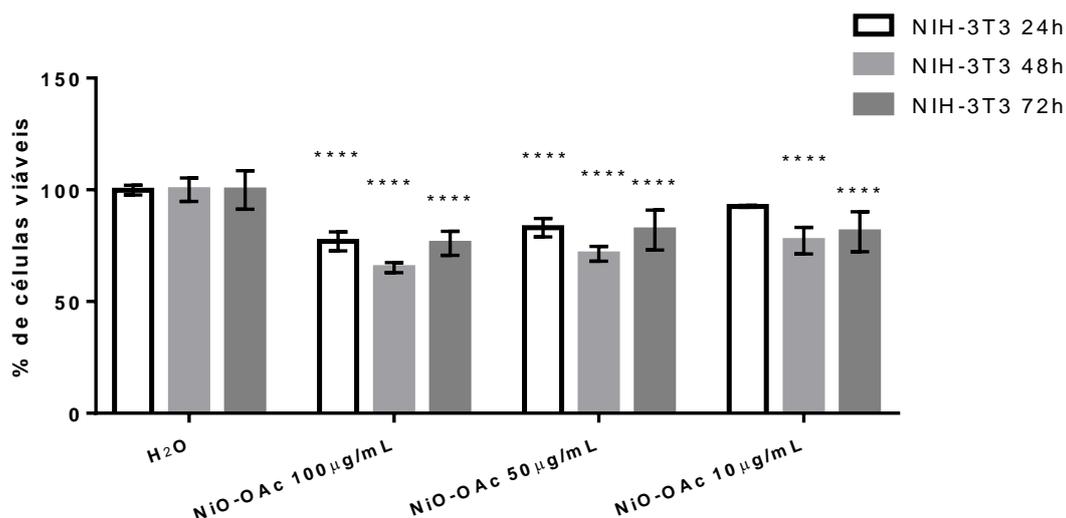


Figura 29. Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NiO-OAc em linhagem celular NIH-3T3 avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 µg/mL e H₂O. Todos os dados foram normalizados com H₂O e Médias ± DP de três triplicatas que são apresentados como P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0,001; **** P ≤ 0.0001.

Assim, por meio da análise destes resultados, podemos inferir que todas as formulações analisadas (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) induziram efeito citotóxico mais acentuado à medida que se aumentou a dose e o tempo de exposição e isto ocorreu de forma similar para ambas as linhagens celulares, NIH-3T3 e HaCat.

Ao se comparar a sensibilidade das linhagens celulares analisadas frente à exposição das três formulações percebemos algumas particularidades relacionadas à toxicidade e que são variáveis de acordo com a dose avaliada. Por exemplo, após o tratamento com NiO-Cl, na dose de 100 µg/mL, o perfil citotóxico foi similar nas duas linhagens. Contudo, nas demais doses (50 e 10 µg/mL) a linhagem NIH-3T3 foi mais sensível. A respeito da formulação NiO-Et observou-se efeito citotóxico mais intenso para a linhagem NIH-3T3. Por outro lado, quanto ao tratamento com a formulação NiO-OAc notou-se que, nas doses de 100 e 50 µg/mL, células da linhagem HaCat foram mais sensíveis em contrapartida com a dose de 10 µg/mL em que as células da linhagem NIH-3T3 foram mais sensíveis do que HaCat.

MAQSOOD *et al.* (2012) avaliaram a viabilidade de células de carcinoma mamário (linhagem MCF-7) expostas à diferentes doses de nanopartículas à base de níquel (0, 1, 2, 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 horas. Estes autores empregaram nanopartículas com diâmetros de cerca de 28 nm, ou seja, similar ao que encontramos em nosso estudo. Ademais, em nosso estudo, nós avaliamos as doses de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h, assim como estes autores. Contudo, em nosso estudo nós avaliamos a viabilidade de células normais de fibroblastos e queratinócitos (linhagens NIH-3T3 e HaCat) em contraste com estes autores que analisaram células de carcinoma mamário (linhagem MCF-7).

De acordo com o estudo conduzido por MAQSOOD *et al.* (2012) NiO-NPs não reduziram a viabilidade de células da linhagem MCF-7 até a dose de 5 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi observada significativa redução na viabilidade destas células. Segundo este estudo, a viabilidade celular nas doses de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi de 86%, 62% e 44%, respectivamente. Em nosso estudo, nós verificamos que as NiO-NPs também reduziram a viabilidade celular a partir da dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens NIH-3T3 e HaCat. Além disso, em nosso estudo, a menor viabilidade encontrada foi de 76% (± 17), 79 (± 20) e 78% (± 29) quando as células HaCat foram expostas ao tratamento NiO-Et no período de 24h em concentrações e período experimental semelhante. Adicionalmente, os autores também verificaram que o efeito citotóxico foi proporcionalmente maior com o aumento das doses, assim como ocorreu em nossos ensaios apesar de se tratar de estudos com linhagens celulares distintas (MCF-7 versus NIH-3T3 e HaCat).

O IC_{50} é uma medida da eficácia de fármacos e indica a concentração que inibe a viabilidade celular em 50%. O IC_{50} também foi calculada a fim de se comparar os efeitos citotóxicos das três formulações (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) empregadas neste estudo (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores de IC₅₀ (valor da concentração de um composto necessária para reduzir pela metade a viabilidade celular) das formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc para linhagens HaCat e NIH-3T3.

Tempo	IC ₅₀ (µg/mL) Linhagem HaCat		
	NiO-Cl	NiO-Et	NiO-OAc
24 h	377 (254 a 643)	249 (115 a 934)	259 (153 a 541)
48 h	351 (258 a 511)	291 (186 a 530)	155 (112 a 224)
72 h	219 (255 a 482)	340 (255 a 482)	151 (113 a 208)
Tempo	IC ₅₀ (µg/mL) Linhagem NIH-3T3		
	NiO-Cl	NiO-Et	NiO-OAc
24 h	320 (249 a 430)	366 (269 a 537)	293 (249 a 352)
48 h	199 (139 a 304)	195 (144 a 276)	143 (352 a 201)
72 h	141 (99 a 210)	223 (166 a 313)	259 (175 a 424)

Analisando o período de 24 h de tratamento entre as três formulações investigadas e as duas linhagens celulares (HaCat e NIH-3T3), notou-se NiO-Et foi a formulação que apresentou o menor valor de IC₅₀ (249 µg/mL) e isto ocorreu na linhagem HaCat, sugerindo que NiO-Et foi mais citotóxica do que as demais (NiO-Cl e NiO-OAc) nesse período e, particularmente, para HaCat. Por outro lado, no período de 48 h de tratamento, a formulação NiO-OAc foi a que induziu maior citotoxicidade em ambas as linhagens, haja vista que observou-se menores valores de IC₅₀ sendo estes de 155 µg/mL na linhagem HaCat e 143 µg/mL em NIH-3T3. Já no período de 72 h notou-se que a formulação NiO-Cl foi a que apresentou o menor valor de IC₅₀ (141 µg/mL) para a linhagem NIH-3T3.

5.5.3. Considerações gerais sobre citotoxicidade das formulações

A partir da análise dos dados referentes a citotoxicidade das nanopartículas de NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc podemos, de certa forma, relacionar o potencial citotóxico destas em células das linhagens NIH-3T3 e HaCat com suas características físico-químicas. Algumas destas características estão sumarizadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Propriedades físico - químicas das nanopartículas.

Nanopartículas	Diâmetro modal (nm)	Potencial Zeta (mV) (7° dia)	Área superficial (m ² /g)
NiO-Cl	17 ± 0,19	-26 ± 0,02	33
NiO-Et	29 ± 0,20	+31 ± 0,08	31
NiO-OAc	27 ± 0,35	+26 ± 0,08	27

Potencial Zeta foi mensurado por DLS (valores referentes ao período de 7 dias. Período necessário para a realização dos ensaios de MTT); média ± desvio padrão. Área superficial foi medida por adsorção de nitrogênio (B.E.T.). A cristalinidade foi determinada por DRX. O diâmetro modal mensurado por MET.

De toda forma, sabemos que não existe um único parâmetro característico associado diretamente à toxicidade de NiO-NPs. Porém, vários fatores (tamanho, área superficial, forma) podem influenciar a atividade citotóxica de NiO-NPs. Utilizamos NiO-NPs com dimensões inferiores a 30 nm, aspecto morfológico predominantemente esférico e apresentando agregação. Cada linhagem celular com sua especificidade reagiu diferentemente de acordo com tratamento e tempo de exposição, conforme está demonstrado na **Figura 30**.

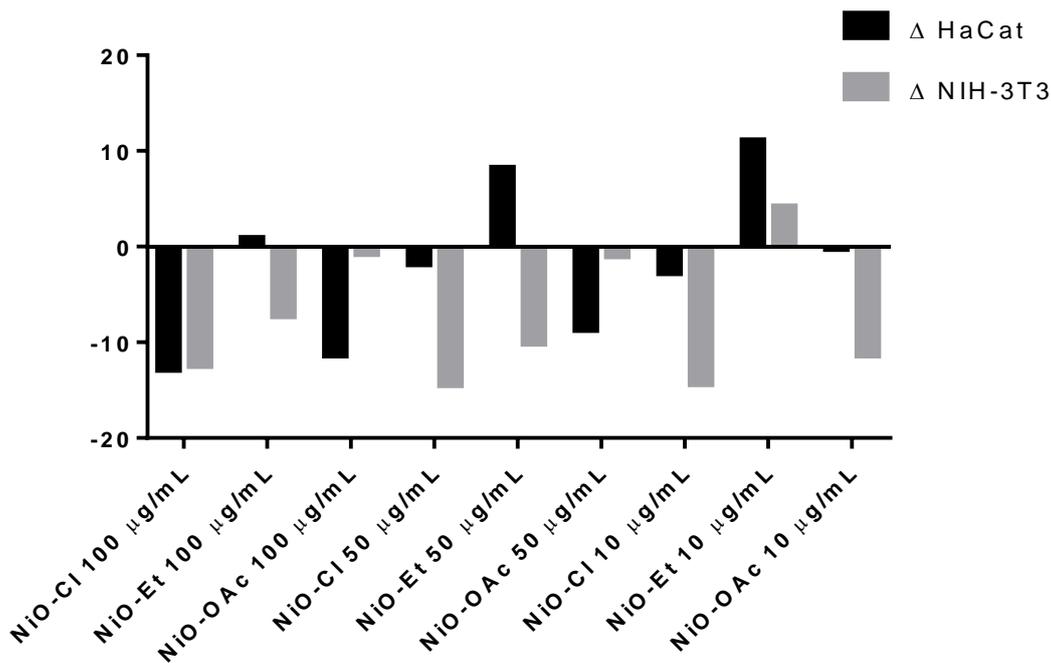


Figura 30. Distribuição da média (delta - Δ) das diferenças entre os valores de viabilidade celular no período final de 72 h e valores de viabilidade celular no período inicial de 24 h para as formulações NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc em linhagens celular HaCat e NIH-3T3. As células foram tratadas com doses de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e H_2O .

Neste trabalho, avaliamos três formulações de NiO-NPs com o objetivo de obtermos partículas menores em cada síntese distinta, mas isto não ocorreu em virtude das condições de síntese. No entanto, analisamos a possível variação de toxicidade entre o mesmo material (NiO-NPs) obtido a partir de diferentes sínteses. Notamos que, de maneira geral, a formulação NiO-OAc induziu maior efeito citotóxico do que as demais formulações, quando se comparou as mesmas doses e linhagens. Contudo, ao se comparar os efeitos das formulações sobre as linhagens, percebeu-se que em cada período de tratamento houve uma resposta diferente, após analisar os diferentes valores de IC_{50} (**Tabela 4**).

Uma das características das formulações, em nosso estudo, é o fato de elas se apresentarem agregadas. De acordo com LU *et al.* (2009), a tendência de NPs à agregação é uma das propriedades mais bem documentadas e também a forma mais possível de exposições humanas. Em nosso trabalho, as NiO-NPs apresentaram citotoxicidade mesmo estando agregadas e estes achados também foram relatados por DONALDSON *et al.* (2005). Estes

autores afirmaram que um aumento da inflamogenicidade, aspecto relacionado à toxicidade, foi associado com o aumento da área superficial de NPs, mesmo formando aglomerados.

De acordo com DUFFIN *et al.* (2007), um estudo realizado com agregados de óxido de titânio (TiO₂) formados a partir de partículas primárias com cerca de 20 nm, ou seja, em faixa de diâmetro similar ao das nanopartículas que produzimos, foi atribuída uma relação de maior toxicidade em decorrência a maior área superficial destas NPs, e foi apontado que a agregação de NPs não afetou a sua toxicidade.

Um estudo realizado por PIETRUSKA *et al.*, (2011) com o objetivo de investigar se a toxicidade de nanopartículas de níquel insolúvel dependia de sua absorção pelas células - alvo, demonstrou os efeitos citotóxicos de óxido de níquel na linhagem H460 humana (células de câncer de pulmão). Observaram que as células da linhagem H460 incorporaram as nanopartículas sendo que estas puderam ser visualizadas dentro dos vacúolos citoplasmáticos após uma exposição de 24 h. Em contraste, não foi observada esta resposta quando as células foram expostas à micropartículas de níquel metálico. As nanopartículas de níquel, dentre estas as de óxido de níquel, causaram uma ativação rápida e prolongada da via de HIF-1 α (fator induzível de hipóxia).

Ainda, de acordo com PIETRUSKA *et al.*, (2011) nanopartículas de níquel induziram citotoxicidade por meio da ativação de apoptose. Esse trabalho mostrou que as nanopartículas de óxido de níquel (NiO-NPs), em contraste com micropartículas de níquel, ativaram uma via característica de toxicidade de compostos de níquel associada à carcinogênese por apresentar ativação sustentada da via de HIF-1 α que, por sua vez, pode promover a transformação da célula e a progressão de um tumor. Observou-se também que aproximadamente 50% do níquel em NiO-NPs é internalizado pela célula em 24 h, enquanto apenas 1 a 3% do níquel disponível em nanopartículas de níquel metálico é internalizado, mesmo após 72 h.

No nosso trabalho, não avaliamos a potencial via que desencadeia a toxicidade. Entretanto, foi possível observar algumas sutis diferenças entre a sensibilidade das células analisadas quando submetidas ao mesmo tratamento. De forma geral, houve maior citotoxicidade no período de 72 h do que em 24 h de tratamento quando se comparou as duas linhagens frente à exposição das três formulações empregadas neste estudo. Ainda, notou-se que formulação NiO-Cl foi mais citotóxica para células da linhagem NIH-3T3 (doses de 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$) do que para HaCat e a formulação NiO-Et também induziu maior efeito citotóxico na linhagem celular NIH-3T3 em todas as doses analisadas (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Quanto à formulação NiO-OAc notou-se que esta demonstrou maior citotoxicidade na linhagem HaCat nas doses de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tendo em vista a análise de todos os ensaios realizados podemos inferir que as formulações que produzimos neste estudo (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) apresentaram características físicas e químicas similares e efeitos citotóxicos particulares que foram influenciados pela dose, tempo de exposição e tipo celular avaliados. Assim, pudemos esclarecer as hipóteses levantadas neste estudo. Em suma, as NiO-NPs induziram efeitos citotóxicos de forma dependente da dose e do tipo celular. Além disso, notamos que as características físicas e químicas peculiares de cada formulação podem influenciar seus efeitos citotóxicos nas condições experimentais adotadas neste estudo.

6. CONCLUSÃO

A síntese das três formulações (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) foram reprodutíveis e são viáveis para produção de nanopartículas de óxido de níquel.

As NiO-NPs demonstraram uma homogeneidade moderada com um PDI menor que 0,4 e estabilidade coloidal moderada de acordo com o potencial Zeta de $-26 (\pm 0,02)$, $+31 (\pm 0,08)$ e $+26 (\pm 0,08)$, apresentando diâmetro hidrodinâmico em número de partículas de $309 \pm (0,20)$, $134 (\pm 1,57)$ e $406 (\pm 16,7)$, respectivamente, para as três formulações citadas acima (estes valores é referente ao 7º dia. Período necessário pra realização das análises de viabilidade celular).

Os diâmetros modal das NiO-NPs, estimados por MET e o diâmetro dos cristalitos por DRX, foram inferiores a 30 nm para as três formulações. As três formulações apresentaram baixa área superficial, quando comparada a NiO-NPs obtidas por sínteses similares realizada por outros autores e foram caracterizadas como mesoporosas. A caracterização por FTIR apontou para banda de ligação Ni-O e a análise de EDS indicou o níquel e oxigênio como constituintes das nossas formulações.

As NiO-NPs produzidas, de uma forma geral, apresentaram efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares (HaCat e NIH-3T3) e o efeito citotóxico das três formulações foi proporcionalmente maior com o aumento da dose e tempo de exposição.

7. PERSPECTIVAS

Considerando tudo o que foi exposto e discutido neste trabalho, sugerimos algumas perspectivas para estudos futuros como:

1. Análise da biodistribuição de NiO-NPs em células poderia ser verificada a partir de análises por MET;
2. Avaliação dos efeitos de NiO-NPs (NiO-Cl, NiO-Et e NiO-OAc) poderiam ser avaliados em linhagens células tumorais;
3. Investigação de outros testes que poderiam ser empregados para compreensão dos mecanismos de ação das NiO-NPs, tais como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO);
4. Os efeitos das NiO-NPs poderiam também ser investigados em modelos animais *in vivo*;
5. E, por último, mas não menos importante, ensaios com compostos solúveis de níquel poderiam ser testados juntamente com as formulações a fim de se obter um padrão de comparação de efeitos citotóxicos.

8. APÊNDICE A

Técnicas de análise e caracterização de nanopartículas

A produção e o desenvolvimento de metodologias analíticas, para a rápida e rigorosa caracterização dos nanomateriais é de especial interesse para o desenvolvimento da nanotecnologia. Assim a compreensão de características físicas e químicas, como o tamanho e a composição de nanopartículas é particularmente importante. Várias são as técnicas disponíveis para a caracterização dos nanomateriais e de suas suspensões. Desse modo, a escolha adequada das técnicas de caracterização deve ser condizente com o tipo de informação que cada técnica pode fornecer e, principalmente, deve-se considerar a complementaridade entre as diversas técnicas. No presente trabalho, foram escolhidas as seguintes técnicas de caracterização: análise termogravimétrica (TG), análise de difração de raios – X, análise de área superficial (B.E.T.), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia por infravermelho (FTIR); espectroscopia de absorção atômica (EAA) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). A definição, aplicações e características de cada uma destas técnicas estão descritas abaixo:

Análise Termogravimétrica – TG

A análise termoanalítica (TG) baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. Os principais dados obtidos a partir da análise de uma curva de TG são a temperatura inicial de cada etapa de decomposição da amostra, temperatura em que a velocidade de cada decomposição é máxima e a temperatura final de decomposição, além da perda de massa da amostra, que é proporcional à área abaixo de cada pico da derivada de TG (DTG). A análise térmica é comumente usada para estudos de nanopartículas (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002).

Os métodos térmicos desempenham um papel significativo na caracterização de nanopartículas metálicas porque é possível realizar medidas clássicas de temperaturas de perda de massa, e verificar a reatividade da superfície com a atmosfera escolhida. Nesse caso, podem-se escolher vários gases como atmosfera (nitrogênio, argônio) e verificar o ganho de massa quando a atmosfera for reativa à nanopartícula ou à espécie química adsorvida. Assim, esta é uma técnica destrutiva, na qual se monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas (ROONASI & HOLMGREN, 2009).

Análise de Difração de Raios – X

A análise de difração de raios-X (DRX) é usada para obter características importantes sobre a estrutura cristalina de um composto. Estas informações são geradas pelo fenômeno físico da difração e também da interferência, ou seja, quando os raios incidem sobre um cristal, ocorre à penetração do raio na rede cristalina e, a partir disso, teremos várias difrações e interferências construtivas e destrutivas, assim, os raios X irão interagir com os elétrons da rede cristalina e serão difratados, permitindo através desta leitura através de um dispositivo capaz de detectar e traçar o desenho da estrutura cristalina, obter informações como presença de fases características e parâmetros de rede (SÁNCHEZ-PASTOR & LUQUE DEL VILLAR, 2011). Para as ondas interferirem construtivamente, a condição de Bragg tem que ser satisfeita, ou seja, deve ocorrer interferência construtiva como demonstrado pela a equação abaixo:

Equação I: Equação de Bragg

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Onde n é a ordem de reflexão (número inteiro), λ é o comprimento de onda da radiação incidente, θ é o ângulo de Bragg, e d a distância entre dois planos atômicos. O lado direito da equação é essencialmente a diferença entre os caminhos percorridos pela onda espalhada nas posições O e O' (**Figura A**) (Myers, 1991). Esta lei estabelece que para um dado comprimento de onda da radiação X incidente. O raio espalhado emergirá apenas em ângulos para os

quais esta condição é satisfeita. Cada pico de difração é produzida por certo conjunto de planos que satisfaça esta condição, permitindo a identificação do composto cristalino formado (ROSENSWEIG, 1997).

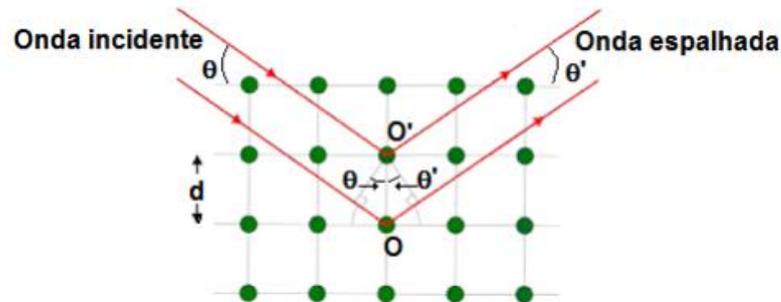


Figura A. Diagrama mostrando a interferência construtiva de raios X numa rede cristalina de átomos (pontos verdes), afastados por uma distância interplanar monocromática (MYERS, 1991).

Os tamanhos de cristalitos de amostras são calculados, utilizando a largura à meia altura dos picos dos difratogramas, introduzida na equação de Scherrer:

Equação II: Equação de Scherrer

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Na qual D é o tamanho do cristalito, λ é o comprimento de onda (0,154 nm), K é a constante igual a 1, β é a largura (metade da altura do pico máximo de difração correspondente a um ângulo 2θ). Assim, cada sólido cristalino possui um padrão de difração único, em função da posição, intensidade e quantidade de máximo de difração (BENAVENTE *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-PASTOR & LUQUE DEL VILLAR, 2011).

Análise textural

Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T) é uma análise também conhecida como ASA (análise de área superficial) mede a área superficial específica por unidade de massa do material investigado. A análise de B.E.T. é um dos

modos mais antigos de caracterização e consiste na medida da fisissorção (adsorção física) de um gás inerte, como o nitrogênio (N_2) e pode ser feita por um único ponto ou por vários pontos da amostra (BARRET *et al.*, 1952).

Os fundamentos da técnica analítica são baseados em uma determinada amostra ser acondicionada em um tubo sob vácuo, resfriada à temperatura criogênica e exposta a um gás análise sob uma série de pressões controladas com precisão. A cada aumento de pressão, o número de moléculas adsorvidas na superfície aumenta. A pressão na qual o equilíbrio da adsorção ocorre é medida e a lei universal dos gases é aplicada para determinar a quantidade de gás adsorvido. Qualquer microporo na superfície é rapidamente preenchido, fazendo com que a superfície livre se torne completamente coberta e finalmente os poros grandes são cheios. O processo deve continuar até o ponto de condensação volumétrica do gás de análise. Em seguida o processo de dessorção deve começar ao passo que a pressão é sistematicamente reduzida resultando na liberação das moléculas adsorvidas (BARRET *et al.*, 1952).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) é uma técnica de caracterização indispensável para determinação do tamanho de nanopartículas. No microscópio eletrônico de transmissão um canhão gera um feixe de elétrons de alta energia que, guiado por um conjunto de lentes magnéticas, incide sobre a amostra. Assim, os feixes transmitidos e difratados são recombinados na construção da imagem, que é projetada na tela do microscópio e capturada por uma única câmara digital, tendo projeções bidimensionais e, portanto, fornece imagem com maior ampliação. O maior benefício desta, frente às demais técnicas, está na capacidade de observação de dois pontos separados por uma dada distância, e assim, quanto menor a distância que o microscópio conseguir distinguir entre dois pontos, maior será a resolução do equipamento, ou seja, o poder de resolução. É uma das técnicas mais adequadas quando se deseja obter imagem direta de NPs (PADILHA, 2013).

Um fator muito importante a considerar quando é utilizada MET é que estes equipamentos precisam de alto vácuo para que os feixes de elétrons não sejam espalhados pelas moléculas de ar caso encontrem-se no interior do tubo e como consequência diminuiria a qualidade da imagem assim como danificaria o equipamento (FULTZ & HOWE, 2012).

Espectroscopia de energia dispersiva de raios-x

A técnica de EDS (energy disersive X-ray dector, EDX ou EDS é uma importante ferramenta de microanálise que fornece composição química qualitativa ou semi quantitativa de regiões ou fases da amostra observada.

Um feixe de elétrons incide sobre a amostra a ser analisada, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição de origem, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes que elemento está sendo observado. Além da identificação, o equipamento ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando mapas composicionais de elementos desejados. (MANNHEIMER, 2002).

Espectroscopia Infravermelho

É uma técnica de análise que permite a obtenção do espectro infravermelho rapidamente. Em vez de se coletar os dados variando-se a frequência da radiação infravermelha, a radiação IV (com todos os comprimentos de onda da faixa usada) é guiada através de um interferômetro. Depois de passar pela amostra o sinal medido é o interferograma. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal resulta-se em um espectro idêntico ao da espectroscopia IV convencional (dispersiva).

Esta técnica espectrométrica permite a análise de espécies orgânicas ou inorgânicas que absorvem radiação infravermelha e podem ser determinadas qualitativamente ou quantitativamente. A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das microondas. Quando falamos de espectroscopia devemos entender como é a interação do feixe de luz que interage com uma amostra. Na natureza existem diversos tipos de feixes de luz e suas respectivas excitações, pois eles dependem diretamente do valor do comprimento de onda (**Figura B**).

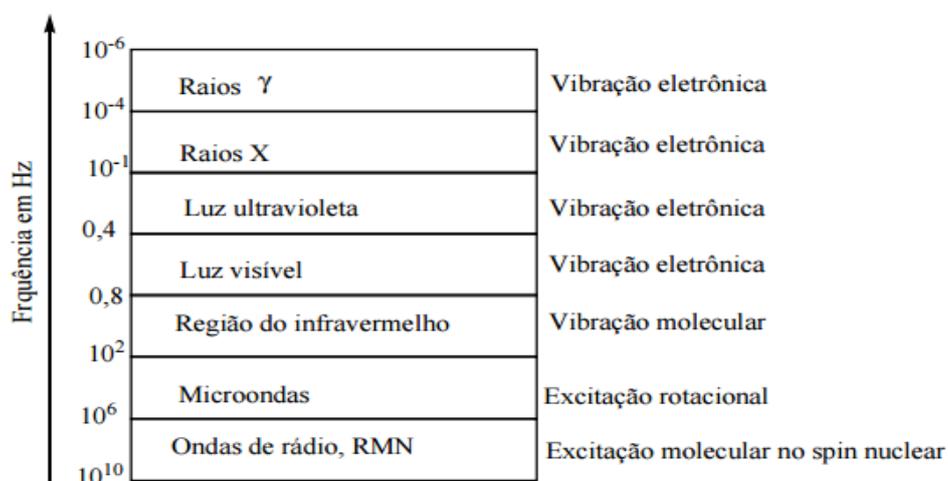


Figura B. Espectro eletromagnético e a excitação molecular (BRUICE, 2006).

Dessa forma, a absorção de radiação infravermelha ocorre quando a frequência de vibração da molécula for igual à frequência de radiação incidente (STUART, 2000). Para obter o espectro de infravermelho de uma amostra, faz-se passar através da amostra um feixe de luz infravermelha, e mede-se a quantidade de energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda. A partir desse conhecimento obtém-se o espectro de absorção ou de transmissão, que demonstra os comprimentos de onda do infravermelho a que a amostra absorve radiação. Pode-se então elucidar que tipos de ligações químicas estão presentes na amostra (STEELE, 2006).

Espectroscopia de absorção atômica

A absorção atômica é uma técnica de espectrometria analítica para determinações quantitativas de elementos baseada na absorção da radiação por átomos livres no estado gasoso (WELZ & SPELING, 1999). Esta técnica está relacionada com a lei de Lambert-Beer, cuja intensidade de radiação absorvida pelos átomos de um elemento específico está diretamente ligada à concentração desse elemento na amostra. As amostras são vaporizadas no intervalo de 2000 a 6000 K, decompondo-se em átomos e uma fonte emite radiação eletromagnética no comprimento de onda característico do elemento de interesse.

Assim, a amostra é atomizada e ocorre a absorção parcial da radiação incidente pela nuvem atômica gerada. A medida dessa absorção é obtida pela razão entre a quantidade de radiação emitida pela fonte e a quantidade de radiação que passa através da zona de observação e atinge o detector, que está relacionada com a concentração do elemento na amostra (WELZ & SPERLING, 1999).

A espectroscopia de absorção atômica apresenta alguns princípios básicos dos quais podemos destacar:

- i. Distinguir sinal de absorção atômica de sinal de absorção de fundo (absorção molecular e espalhamento de radiação)
- ii. Produzir nuvem de átomos no estado fundamental.
- iii. Incidir na nuvem de átomos de radiação com comprimento de onda adequado.

Esse método de análise é frequentemente aplicado à determinação quantitativa de metais e semi-metais em amostras alimentícias, ambientais, geológicas, biológicas entre outras, de maneira rápida, simples e precisa (WELZ & SPERLING, 1999; HARRIS, 2001).

Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica de DLS, cujas siglas em inglês significa *Dynamic Light Scattering*, faz referência à correlação espectroscópica de fótons, permitindo medir o diâmetro hidrodinâmico das partículas num meio, assim como medir o Índice de Polidispersão (PDI) da amostra e também sua estabilidade através do Potencial Zeta (PZ). Quando temos um colóide ionizado que interage com sua atmosfera carregada positivamente, produz um potencial elétrico relativo à solução, e isso tem um valor máximo na superfície e diminui gradualmente com a distância próximo de zero fora da camada difusa. A diminuição do potencial e a distância desde o colóide é um indicador da força repulsiva entre os colóides em função da distância nas quais essas forças estejam atuando, em outras palavras o Potencial Zeta (PZ) está diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre cargas vizinhas, o qual é um dado importante porque pode ser medido de uma forma simples e direta (YU & XIE, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKE, M.; GROPPPEL, B.; KRONEMANN, H.; GRÜN, M. Nickel--an essential element. IARC Sci Publ. 1984;(53):339-65.

ANANDAN, K.; RAJENDRAN, V.; Morphological and size effects of NiO nanoparticles via solvothermal process and their optical properties, Solid State Electron, 14, 43-47, 2011.

ATKINS, P., et al. Físico- Química, 7ª Edição, livros Técnicos e Científicos, RJ, 2000.

BAI, C.; LIU, M., From Chemistry to Nanoscience: Not Just a Matter of Size, 2013.

BAIRD, C. Química ambiental. Trad. M.A.L. Recio e L.C.M. Carrera. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BANGS, L. B. New developments in particle-based immunoassays: Introduction, Pure Appl. Chem. 68,1873-1879, 1996.

BARRA, C.M. et al. Especificação de arsênio – uma revisão. Química Nova, v. 23, n. 1, p. 58-70, 2000.

BECK, J S; SCHMITT, K. D.; HIGGINS, J. B.; SCHLENKERT, J. L. New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. J. Am. Chem. Soc. n. 14, p. 10834-10843, 1992.

BARRET, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P.P. THE Determination of pore Volume and Area Distribution in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. Journal of the American Chemical Society. 73, p. 37380, 1952.

BENAVENTE, D.; CAÑAVERAS, J. C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, J.; CERVERA, M. C. M.; GARCÍA, M. Á. R.; ORDÓÑEZ, S. Identificación de minerales mediante difracción de rayos X utilizando bases de datos online de libre acceso. Enseñanza de las Ciencias de la Tierra, 20, 3, p. 280, 2012.

BI, H.; LI, S.; ZHANG, Y.; DU, Y. Ferromagnetic-like behavior of ultrafine NiO nanocrystallites. J Magn Magn Mater, 277, 363-367, 2004.

BIJU, V.; KHADAR, M. A. Fourier transform infrared spectroscopy study of nanostructured nickel oxide, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 59, 121-134, 2003.

BRUICE, P. Y. Química Orgânica. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, v. 2., 2006.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, 4, p. MR17-MR71, 2007.

CAPASSO, L.; CAMATINI, M.; GUALTIERI, M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett.* 226, 1, p. 28–34, 2014.

CARNES, C. L.; STIPP, J.; KLABUNDE, K. J. Synthesis, Characterization, and Adsorption Studies of Nanocrystalline Copper Oxide and Nickel Oxide. *Langmuir*, 18, 1352-1359, 2002.

CASTRO, A. L. C. 1990. Glossário de defesa civil: estudo de riscos e medicina de desastres. Brasília: MPO/ Departamento de Defesa Civil

CHEN, D.H.; HSIEH, C.H. Synthesis of nickel nanoparticles in aqueous cationic surfactant solutions, *Journal of Materials Chemistry*, v. 12, p. 2412-2415, 2002.

CHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22, p. S6-S11, 1994.

CHITHRANI, B. D.; CHAN, W.C.W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.*; 7:1542–50, 2007

CHOI, H. S. et al. Renal clearance of quantum dots. *Nature biotechnology*, Estados Unidos, p. 1165-1170. 23 set. 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Resolução do CONAMA nº 357 de 2005. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> data de acesso 15/08/2015.

CORY, A. H.; OWEN, T. C.; BARLTROP, J. A.; CORY, J. G. Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture. *Cancer Communications*, 3, p. 207-212, 1991.

COUTO, G. G., et al., Nickel nanoparticles obtained by modified polyol process: synthesis, characterization, and magnetic properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 311,461-468, 2007.

CULLITY, B.D. Elements of X-ray diffraction. 2 ed. Canada: Addison- Wesley, , p. 99, 1978.

DENG, X.; CHEN, Z. Preparation of nano-NiO by ammonia precipitation and reaction in solution and competitive balance, *Mater Lett*, 58, 276-280, 2004.

DHARMARAJ, N.; PRABU, P.; NAGARAJAN, S.; KIM, C.H.; PARK, J.H.; KIM, H.Y. Synthesis of nickel oxide nanoparticles using nickel acetate and poly(vinyl acetate). *Materials Science and Engineering B*, 128,111–114, 2006.

DOLL, R.; PETRO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Câncer Inst.* 1981.

DONALDSON K.; STONE V.; TRAN C.L.; KREYLING W.; BORM P.J.; *Nanotoxicology. Occup Environ Med.* 61, 9, 727-8, 2004.

DONALDSON, K.; TRAN, L.; JIMENEZ, L.A.; DUFFIN, R.; NEWBY, D.E.; MILLS N., et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2:10, 2005.

DU, Y.; WANG, W.; LI, X.; ZHAO, J.; MA, J.; LIU, Y.; LU, G. Preparation of NiO nanoparticles in microemulsion and its gas sensing performance, *Mater Lett*, 68, 168-170, 2012.

DURÃES, A. M. M., SOUSA, F. A. R., GUIMARÃES, M. R. P. d'Eça. Níquel. *Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal*, 2006/2007.

DUFFIN R, TRAN L, BROWN D, STONE V, DONALDSON K. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal Toxicol.* 19(10):849-56, 2007.

ENDO, S.; UCHIDA, K. Preparation of suspension of nano-sized particles for toxicology test. In *International symposium on the risk assessment of manufactured nanomaterials*, NEDO-AIST-OECD, Tokyo, p. 36–40, 2008.

EVERET, D. H. *Basic principles of colloid science*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1988.

FARRÉ, M.; GAJDA-SCHRANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D.; *Anal. Bioanal. Chem.* Nov, 6, 2008.

FRANCHINI, R. et al. Chromium. In: ALESSIO, L. et al. *Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial chemicals*. Luxembourg: Commission of the European Communities, p. 31-51, 1984.

FUKUI, T.; OHARA, S.; OKAWA, H.; HOTTA, T.; NAITO, M. Properties of NiO cathode coated with lithiated Co and Ni solid solution oxide for MCFCs, *J Power Sources*, 86, 340-346, 2000.

FULTZ, B.; HOWE, J. M. *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*. Springer Science & Business Media, 2012.

GOLDSBY, R., A.; KINDT, T.; J.; OSBORNE, B., A.; KUBY, J. *Imunologia de Kuby*, 6.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008.

GUAZZELLI, M. J.; PEREZ, J. *Nanotecnologia - A manipulação do invisível - Centro Ecológico Disponível em:*
http://www.centroecologico.org.br/novastecnologias/novastecnologias_1.pdf,
2009. Acesso abril de 2016.

GUTHRIE, F. E.; PERRY, J.J. *Introduction to Environmental Toxicology*, Elsevier, N. Y., 484, 1980.

HAMOND, P. B.; BELILES, R. P. *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*, R. Doull et al (eds), Macmillan, N. Y, 406-467, 1980.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 5a ed. Trad. C. A. S. RIEHL & A. W. S GUARIANO. Rio de Janeiro, LTC Livros Técnicos e Científicos, p.862, 2001.

HELLE, J. G. H.; THORNILL, P. G.; CONARD, B. R. New views on the hypothesis of respiratory cancer risk from soluble nickel exposure; and reconsideration of this risk's historical sources in nickel refineries. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4, 23, 2009.

HEO, D. S.; PARK, J. G.; HATA, K.; DAY, R.; HERBERMAN, R. B.; WHITESIDE, T. L. Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Res*, v. 50, n. 12, p. 3681-90, 1990

HOSNY, N. M. Synthesis, characterization and optical band gap of NiO nanoparticles derived from anthranilic acid precursors via a thermal decomposition route, *Polyhedron*, 30, 470-476, 2011.

HOTOVY, I.; HURAN, J.; SPIESS, L.; HASCÍK, S.; REHACEK, V. Preparation of nickel oxide thin films for gas sensors applications, *Sens Actuators B Chem*, 57, 147-152, 1999.

HUNTER, R. J. *Foundations of colloid science*. Oxford, UK: Clarendon Press, 1986.

ICHIYANAGI, Y.; WAKABAYASHI, N.; YAMAZAKI, J.; YAMADA, S.; KIMISHIMA, Y.; KOMATSU, E.; TAJIMA, H. Magnetic properties of NiO nanoparticles, *Physica B Condens Matter*, 329-333, 862-863, 2003.

IZAKI, Y.; MUGIKURA, Y.; WATANABE, T.; KAWASE, M.; SELMAN, J.R. Direct observation of the oxidation nickel in molten carbonate, *J Power Sources*, 75, 236-243, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Livro Histologia Básica*, Guanabara koogan, 2004.

KASHEVSKY, B. E.; AGABEKOV, V. E.; KASHEVSKY, S. B.; KEKALO, K. A.; MANINA, E.Y.; PROKHROV, I.V. Study of cobalt ferrite nanosuspensions for low-frequency ferromagnetic hyperthermia. *Particuology*.6, 322-333, 2008.

KETTIGER H, SCHIPANSKI A, WICK P, HUWYLER J. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: From cell to organism. *Int J Nanomedicine*, 8:3255–69, 2013.

KIILUNEN, M. et al. Analysis storage stability and reference values for urinary chromium and nickel. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, Berlin, v. 59, n. 1, p. 43-50, 1987.

LI, X.; ZHANG, X.; LI, Z.; QIAN, Y. Synthesis and characteristics of NiO nanoparticles by thermal decomposition of nickel dimethylglyoximate rods, *Solid State Commun*, 137, 581-584, 2006.

LIMA, V. F.; MERÇON, F. *Metais Pesados no Ensino de Química Vol. 33, N° 4, NOVEMBRO 2011.*

LIU, G.; GAO, J.; AI, H.; CHEN, X. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, v. 9, n. 9-10, p. 1533-1545, 2013.

LYGRE, H. et al. Biologie testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. *Acta Odontologica*, 53, 6, p. 397-401, 1995.

LU, S.; DUFFIN, R.; POLAND, C.; DALY, P.; MURPHY, F.; DROST, E.; MACNEE, W.; STONE, V.; DONALDSON, K. Efficacy of Simple Short-Term *in Vitro* Assays for Predicting the Potential of Metal Oxide Nanoparticles to Cause Pulmonary Inflammation. *Environ Health Perspect.* 117(2):241-7, 2009.

MAGAYE, R.; ZHAO, J. Recent progress in studies of metallic nickel and nickel-based nanoparticles genotoxicity and carcinogenicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 4, 3, p. 644–650, 2012.

MAKHLOUF, S. A.; PARKER, F. E.; BERKOWITZ, A. E. Magnetic anomalies in NiO nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 81, 8, 5561-5563, 1997.

MAHMOOD, M.; CASCIANO, D. A.; MOCAN, T.; IANCU, C.; XU, Y.; MOCAN, L.; IANCU, D.T.; DERVISHI, E.; LI, Z.; ABDALMUHSEN, M.; BIRIS, A.R.; ALI, N.; HOWARD, P.; BIRIS, A. S. Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. *J Appl Toxicol*. 30:74–83, 2010.

MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. User Manuals, England, 2004. Disponível em: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man_317-1.1.pdf. Acesso em novembro de 2015.

MANNHEIMER, W.A., *Microscopia dos Materiais - Uma Introdução*, Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, E-papers, 2002.

M. A. SIDDIQUI, M. AHAMED, J. AHMAD, M.A. M. KHAN, J. M. ABDULAZIZ A. AL-KHEDHAIRY, SALMAN A. ALROKAYAN, Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 641–647, 2012.

MOHAMMADIJOO, M.; KHORSHIDI, Z. N.; SADRNEZHAAD, S.K.; MAZINANI, V. Synthesis and characterization of nickel oxide nanoparticle with wide band gap energy prepared via thermochemical processing *Nanoscience and Nanotechnology: An International Journal*. Received 19 February, 2014.

MOHSENI, M. S.; HOSSEINI, S. A.; REZAEI, M.; SADRNEZHAAD, S.K.; MOHAMMADYANI, D. Synthesis of Wide Bandgap Nanocrystalline NiO Powder via a Sonochemical Method, *Ultrason Sonochem*, 19, 841-845, 2012.

MONTEIRO-R, N. A.; TRAN, C. L. *Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects*. Informa Healthcare, New York. p. 450, 2007.

MORGANTI P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *ClinCosmet Investig Dermatol*, 3:5–13, 2010.

MORIMOTO, Y.; HIROHASHI, M.; OGAMI, A. et al. Pulmonary toxicity following an intratracheal instillation of nickel oxide nanoparticle agglomerates. *Journal of Occupational Health*. 53, 4, p. 293–295, 2011.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55–63.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: Editora, p. 113-115, 2002.

MUÑOZ, A.; COSTA, M. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 260, n. 1, p. 1-16, 2012.

MYERS, D. *Surfaces, interfaces, and colloids principles and applications*. VCH Publishers, New York 1991, 433 pp., bound, DM 84,-, ISBN 1-56081-033-5.

NATH N, CHILKOTI A. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance. *J Am Chem Soc*. 2001 Aug 29; 123(34):8197-202.

ODENCBACH, S. Recent progress in magnetic fluid research. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16, 1135-R1150, 2004.

OGAMI, A., MORIMOTO, Y., MYOJO, T., OYABU, T., MURAKAMI, M., TODOROKI, M., NISHI, K., KADOYA, C., YAMAMOTO, M., TANAKA, I. Pathological features of different sizes of nickel oxide following intratracheal instillation in rats. *Inhal. Toxicol.* 21, 812–818, 2009.

OZIN, G. A., *Nanochemistry - synthesis in diminishing dimensions*, *Advanced Materials*, 4, 612, 1992.

PADILHA, A. F. *Microscopia eletrônica de transmissão*. Angelo Fernando Padilha Professor Titular do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EP USP, 2013.

PATIL V. et al. Effect of annealing on structural, morphological, electrical and optical studies of nickel oxide thin films. *JSEMAT*. 1, 35–41, 2011.

PIETRUSKA, J. R.; LIU, X.; SMITH, A.; MCNEIL, K.; WESTON, P.; ZHITKOVICH, A.; HURT, R.; KANE, A. B. Bioavailability, Intracellular Mobilization of Nickel, and HIF-1 α Activation in Human Lung Epithelial Cells Exposed to Metallic Nickel and Nickel Oxide Nanoparticles. *Oxicological Sciences* 124(1), 138–148, 2011.

PRADEP, T., ANSHUP. Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. *Thin Solid Films*, 517, 6441-6478, 2009.

ROONASI, P.; HOLMGREN, A. A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nanoparticle surface. *Applied Surface Science*, 255, 11, p. 5891-5895, 2009.

RICHARDSON, J. T.; YIAGAS, D. I.; TURK, B.; FORSTER, K.; TWIGG, M. V. Origin of superparamagnetism in nickel oxide, *J Appl Phys*, 70, 6977-6982, 1991.

ROSENSWEIG, R.E., *Ferrohydrodynamics*. Dover publication, INC, 1997.

SCHROEDER, H. A. A sensible look at air pollutions by metals. *Archives of Environmental Health*, Chicago, v. 21, n. 6, p. 798-806, 1970.

SÁNCHEZ-PASTOR, N.; LUQUE DEL VILLAR, F. J. *Mineralogía II de Grado en Geología. Prácticas. 10. Introducción a la difracción de Rayos X. REDUCA (Geología)*, 3, 4, 2011.

SIGEL, A., H.; SIGELE, R. K. O.; SIGEL, E.D.S. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature. Metal Ions in Life Sciences*. West Sussex, England, John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

SING, K.S.W.; EVERETT, D.H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R.A. Rouquerol, J., and Siemieniowska, T., 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (recommendations 1984). *Pure and Applied Chemistry*. 57, 4, 603–619, 2009.

STEELE, D. *Infrared Spectroscopy: Theory*. In: (Ed.). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

STUART, B. *Infrared Spectroscopy*. In: (Ed.). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*: John Wiley & Sons, Inc., 2000.

TIMBRELL, J.; *Principles of Biochemical Toxicology*, Fourth Edition; pages 335-339, 2008.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. *Nanoparticulate drug delivery systems*. Informa Healthcare, New York. p.4, 2007.

TOMA, H. E. *O mundo nanométrico: a dimensão do novo século*. Editora oficina de textos, p. 102, 2004.

TOMINAGA, L. K., SANTORO, J. e AMARAL, R. (Orgs.). *Desastres naturais: conhecer para prevenir*. São Paulo: Instituto Geológico, p.14, 2009.

VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for remediation of heavy metal pollution. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00618.x> 327-338 First published online: 1 November, FEMS Microbiology Reviews, 2002.

WANG, G.; ZHANG, L.; MOU, J. Preparation and Optical Absorption of Nanometer-sized NiO Powder, *Acta Physico-Chimica Sinica*, 13, 445-448, 1997.

WANG, W.; LIU, Y.; XU, C.; ZHENG, C.; WANG, G. Synthesis of NiO nanorods by a novel simple precursor thermal decomposition approach, *Chem Phys Lett*, 362, 119-122, 2002.

WANG, Y.; KE, J. J. Preparation of nickel oxide powder by decomposition of basic nickel carbonate in microwave field with nickel oxide seed as a microwave absorbing additive, *Mater Res Bull*, 31, 55-61, 1996.

WANG, Y.; ZHU, J.; YANG, X.; LU, L.; WANG, X. Preparation of NiO nanoparticles and their catalytic activity in the thermal decomposition of ammonium perchlorate. Materials Chemistry Laboratory, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China Received 9 March 2005; received in revised form 17 June 2005; accepted 17 June 2005.

WEI, Z.; QIAO, H.; YANG, H.; ZHANG, C.; YAN, X. Characterization of NiO nanoparticles by anodic arc plasma method, *J Alloys Compd*, 479, 855-858, 2009.

WELZ, B.; SPERLING, M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd ed. Weinheim, Wiley-VCH, p. 941, 1999.

WHO. Nickel. Geneva, 1991. (International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, n. 108).

WONG, Y. W. H.; YUEN, C. W. M.; LEUNG, M. Y. S.; KU, S.K.A; LAM, H.L.I. Selected applications of nanotechnology in textiles. *Autex Res J*. 6:1-8, 2006.
Wwww3w

WU, Y.; HE, Y.; WU, T.; CHEN, T.; WENG, W.; WAN, H. Influence of some parameters on the synthesis of nanosized NiO material by modified sol-gel method, *Materials Letters*, 61, 14-15, 3174-3178, 2007.

XIANG, L.; DENG, X. Y.; JIN, Y. Experimental study on synthesis of NiO nanoparticles, *Scr Mater*, 47, 219-224, 2002.

YU, W.; XIE, H. A review on nanofluids: preparation, stability mechanisms, and applications. *J. Nanomaterials*, v. 2012, p. 1-17, 2012.

ZHANG, Q.; YUKINORI, K.; ZHU, X. et al. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel after intratracheal instillation. *J Occup Health*.45, 1, p. 23–30, 2003.

ZHAO, F.; ZHAO, Y.; LIU, Y.; CHANG, X.; CHEN, C.; ZHAO, Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*, 7:1322–37, 2011.