

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

BEATRIZ LIMA ROQUETT

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES A BASE DE
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA AMORFA SINTÉTICA (INS 551) EM CÉLULAS
DO TUBO DIGESTÓRIO**

DUQUE DE CAXIAS
2025

BEATRIZ LIMA ROQUETT

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES A BASE DE
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA AMORFA SINTÉTICA (INS 551) EM CÉLULAS
DO TUBO DIGESTÓRIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional-BIOTRANS, Universidade do Grande Rio - AFYA, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador:

Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira (INMETRO)

Coorientador:

Dr. Wanderson de Sousa (INMETRO)

DUQUE DE CAXIAS

2025

CATALOGAÇÃO NA FONTE
AFYA UNIVERSIDADE UNIGRANRIO – BIBLIOTECA EUCLIDES DA CUNHA

R786a Roquett, Beatriz Lima.

Avaliação da citotoxicidade de aditivos alimentares a base de nanopartículas de sílica amorfa sintética (INS 551) em células do tubo digestório / Beatriz Lima Roquett. – Duque de Caxias, 2025.

108 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Afya Universidade Unigranrio, Escola de Ciências da Saúde, Duque de Caxias, 2025.

Orientador: Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira.

Coorientador: Dr. Wanderson de Sousa.

Referências: f. 92-108.

1. Biomedicina translacional. 2. INS 551. 3. Sílica amorfa sintética. 4. Nanopartículas de sílica. 5. Sistema gastrointestinal. I. Pereira, Leonardo da Cunha Boldrini. II. Sousa, Wanderson de. III. Afya Universidade Unigranrio. IV. Título.

CDD – 610


BEATRIZ LIMA ROQUETT

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ADITIVOS ALIMENTARES A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA AMORFA SINTÉTICA (INS 551) EM CÉLULAS DO TUBO DIGESTÓRIO


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

Aprovado em 5 de setembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **CELSO BARBOSA DE SANT ANNA FILHO**
Data: 05/09/2025 11:21:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Celso Sant'Anna
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO
Presidente da banca



Profa. Dra. Ana Lopes Ribeiro
International Iberian Nanotechnology Laboratory – INL (Braga, Portugal)

Assinado por: Carla Sofia Ferreira Baptista
Num. de Identificação: BI14261767
Data: 05-09-2025 17:11:41 +01:00

Profa.  **Carla Sofia Ferreira Baptista**
Universidade do Porto - UPorto (Portugal)

Documento assinado digitalmente
 **SERGIAN VIANNA CARDOZO**
Data: 07/10/2025 20:21:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral
Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS

DEDICATÓRIA

À Deus e aos meus familiares por estarem sempre comigo me orientando e me dando forças por toda a minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos, guiando meus passos e colocando pessoas incríveis ao longo dessa trajetória. Por me fortalecer, capacitar e cuidar de mim para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, Carla e Ricardo, que foram a minha base. Agradeço profundamente por todo o amor, incentivo e apoio incondicional. Eles foram essenciais nesta caminhada, me aconselhando e me confortando nos momentos difíceis. Sem eles, essa conquista não seria possível.

À minha família, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. O apoio e incentivo deles foram fundamentais para que eu persistisse e seguisse em frente. Obrigada por estarem ao meu lado em cada passo dessa jornada.

Ao Matheus, meu porto seguro, que esteve ao meu lado em todos os momentos. Sua presença trouxe serenidade e força nos dias mais difíceis. Obrigada por sempre cuidar de mim e por me ajudar a concluir essa etapa tão importante da minha vida.

Ao meu orientador, Leonardo Boldrini, agradeço pela confiança, incentivo e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe. Seu acolhimento, ensinamentos e apoio foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao meu amigo e coorientador Wanderson de Souza, cuja paciência, compreensão e dedicação foram essenciais para minha trajetória. Obrigada por ter compartilhado o seu conhecimento com carinho e generosidade. Sem seu apoio, eu não teria chegado até aqui.

À Marcella e à Lilian, que tornaram essa jornada mais leve e cheia de alegria. Seu apoio e amizade foram preciosos em cada etapa do caminho.

Aos meus amigos que estiveram comigo ao longo dessa jornada, meu profundo agradecimento. Em especial, à Angela, Bárbara Gomes, Ekeveliny e Myrella.

EPÍGRAFE

"O importante é nunca parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir."

Albert Einstein

RESUMO

O uso crescente de sílica amorfa sintética (SAS) como aditivo alimentar (INS 551) gera preocupações sobre os potenciais riscos à saúde. Apesar de sua ampla aplicação, ainda há lacunas significativas sobre os efeitos biológicos dessas partículas, especialmente pela falta de regulamentação específica sobre seu tamanho. O objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade in vitro e o potencial imunomodulador de nanopartículas de SAS de grau alimentício (E551) em modelos gastrointestinais humanos (Caco-2 e FGH). A metodologia consistiu na aquisição do aditivo da indústria Sagaragi (Santo Amaro, SP) e sua caracterização por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), SDS-PAGE e espectroscopia UV-visível. Para a avaliação biológica, células Caco-2 e FGH foram expostas a concentrações de 19,82–200 µg/mL por 72 h. Foram realizados ensaios de viabilidade (MTT e xCELLigence), estresse oxidativo (ROS), análise de alterações morfológicas e internalização (MET/MEV), e análise de citocinas. Os resultados da caracterização confirmaram a composição de silício e oxigênio e a estrutura amorfa das SAS, além da presença de proteínas adsorvidas à sua superfície. O espectro UV-visível demonstrou que a coloração da amostra não interferiria nos ensaios colorimétricos. O DLS indicou comportamento de agregação dependente da dispersão (A e B). Os ensaios biológicos mostraram viabilidade superior a 75% e ausência de estresse oxidativo significativo. A microscopia confirmou a internalização das nanopartículas, sem danos celulares marcantes, embora concentrações elevadas tenham induzido alterações discretas na morfologia. A análise de citocinas indicou um perfil de imunomodulação associado à exposição ao INS 551. Como conclusão, os resultados indicam que o INS 551 não compromete a viabilidade celular em exposições agudas. No entanto, sua capacidade de internalização e de causar alterações morfológicas, junto com a possível modulação da resposta imune, sugere a necessidade de cautela. O estudo ressalta a importância de padronizar os protocolos de dispersão para avaliações toxicológicas precisas e aponta para a necessidade de futuras investigações sobre os efeitos de exposições crônicas e desfechos inflamatórios a longo prazo.

Palavras-chave: INS 551; Nanopartículas de Sílica; Sílica amorfa sintética; Citotoxicidade; Trato gastrointestinal;

ABSTRACT

The increasing use of synthetic amorphous silica (SAS) as a food additive (INS 551) raises concerns about potential health risks. Despite its widespread application, there are still significant gaps regarding the biological effects of these particles, especially due to the lack of specific regulation on their size. The objective of the study was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and immunomodulatory potential of food-grade SAS nanoparticles (E551) in human gastrointestinal models (Caco-2 and FGH). The methodology consisted of acquiring the additive from the Sagaragi industry (Santo Amaro, SP) and characterizing it by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), X-ray Diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), SDS-PAGE, and UV-visible spectroscopy. For the biological evaluation, Caco-2 and FGH cells were exposed to concentrations of 19.82–200 µg/mL for 72 hours. Viability assays (MTT and xCELLigence), oxidative stress (ROS), analysis of morphological changes and internalization (TEM/SEM), and cytokine analysis were performed. The characterization results confirmed the composition of silicon and oxygen and the amorphous structure of SAS, as well as the presence of proteins adsorbed on their surface. The UV-visible spectrum demonstrated that the sample's coloration would not interfere with colorimetric assays. The DLS indicated aggregation behavior dependent on dispersion (A and B). The biological assays showed viability above 75% and no significant oxidative stress. Microscopy confirmed the internalization of nanoparticles without marked cellular damage, although high concentrations induced slight morphological alterations. Cytokine analysis indicated an immunomodulatory profile associated with exposure to INS 551. In conclusion, the results indicate that INS 551 does not compromise cell viability in acute exposures. However, its capacity for internalization and causing morphological alterations, along with possible modulation of the immune response, suggests caution. The study emphasizes the importance of standardizing dispersion protocols for accurate toxicological assessments and points to the need for future investigations on the effects of chronic exposures and long-term inflammatory outcomes.

Keywords: INS 551; Silica Nanoparticles; Synthetic Amorphous Silica; Cytotoxicity; Gastrointestinal Tract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da evolução da alimentação humana	20
Figura 2. Comparação da organização estrutural entre a sílica amorfa e a sílica cristalina.....	23
Figura 3. Esquema dos obstáculos fisiológicos enfrentados pelas NPs ao transitarem no trato gastrointestinal.....	27
Figura 4 A composição elementar do INS 551	47
Figura 5. Micrografia de MEV do aditivo INS 551	48
Figura 6. Análise da estrutura cristalina do INS 551	49
Figura 7. Tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ do INS 551 sem dispersão.	50
Figura 8. Tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ do INS 551 Dispersão A.....	51
Figura 9. Tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ do INS 551 Dispersão B.....	52
Figura 10. Distribuição percentual da intensidade em função do tamanho hidrodinâmico (d.nm) do INS 551 em diferentes meios.....	52
Figura 11. Morfologia do INS 551 por MEV	53
Figura 12. Micrografias de MEV das partículas de INS 551 mostrando superfície irregular e porosa.....	54
Figura 13. Micrografias de MET de INS 551.	55
Figura 14. Análise do INS 551 por MET em DMEM Low Glucose (A e B) e DMEM High Glucose (C e D).....	56
Figura 15. SDS-PAGE evidenciando a adsorção de proteínas no INS 551.....	57
Figura 16. Avaliação da absorvância do INS 551 por UV-Visível.....	59
Figura 17. Avaliação da integridade e precisão da pipetagem nas linhas celulares Caco-2 (B) e FGH (A)	60
Figura 18. Tempo de duplicação celular após os tempos de 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao INS 551.....	61
Figura 19. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição ao INS 551 na linhagem Caco-2	63
Figura 20. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição ao INS 551 na linhagem FGH.....	64

Figura 21. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição ao INS 551 na linhagem L929..	65
Figura 22. Ensaio de impedância elétrica das células Caco-2 (A) e FGH (B) após a exposição de INS 551.	67
Figura 23. Porcentagem do IC das células Caco-2 (A) e FGH (B) normalizada em relação ao controle negativo, após 72 h de tratamento com INS 551.	68
Figura 24. Análise da internalização das NPs de INS 551 por MET após 72 h de exposição à concentração máxima de 200 µg/mL.	69
Figura 25. Micrografias por MEV das células Caco-2 após 72 h de exposição NPs de INS 551.	70
Figura 26. Micrografias por MEV das células FGH após 72 h de exposição NPs de INS 551.	71
Figura 27. Ensaio de liberação de ROS após 72 h de exposição ao INS 551	73
Figura 28. Avaliação da resposta inflamatória após exposição ao INS 551	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Especificações de proteína e peso molecular.....	57
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°	Graus
±	Mais ou menos
≈	Aproximadamente
~	Aproximadamente
Å	Ångstrom
°C	Graus Celsius
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	micrômetro
λ	Comprimento de onda
θ	Teta
ζ	Zeta
ADI	Ingestão Diária Aceitável
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Apoptosis-associated speck-like containing a CARD
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
Caco-2	Células Epiteliais de Adenocarcinoma Colorectal
CI	Índice célula- <i>Cell index</i>
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Gás Carbônico
CONASS	Conselho Nacional de Secretários de Saúde
Da	Dalton
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DRX	Difração de Raios-X
E551	Número europeu para dióxido de silício (aditivo alimentar)
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FDA	Food and Drug Administration
FGH	Fibroblastos Gengivais Humanos
g/Kg	Grama por quilograma
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN- γ	Interferon-gama
ISO	Organização Internacional de Normalização
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INS	International Numbering System for Food Additives
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Interleucina-1 receptor antagonista
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-9	Interleucina-9
IL-10	Interleucina-10
IL-12 (p70)	Interleucina-12 (subunidade p70)
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
IP-10	Interferon-gamma-inducible Protein 10
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
kV	Quilovolt
LABIO	Laboratório de Bioengenharia Tecidual
L929	Linhagem celular de fibroblastos Murinos
LOG	Logaritmo
M	Molar

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 β
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mV	Milivolts
MTT	<i>3-4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide</i>
nm	Nanômetro
NM	Nanomaterial
NLRP3	Inflamassoma direto
NP	Nanopartícula
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (nível sem efeito adverso observado)
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
O	Oxigênio
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PDI	Índice de Polidispersão
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PDL	Population Doubling Level (tempo de duplicação celular)
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
pm	Picômetro
PS	Penicilina-estreptomicina
PZ	Potencial Zeta
R ²	Coeficiente de determinação
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
s	Segundo(s)
SAS	Sílica Amorfa Sintética
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFB	Soro Fetal Bovino
Si	Silício
SiO ₂	Dióxido de Silício
TIO	Caldo Tioglicolato
TSB	Caldo Casoy
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
V	Voltz
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
UE	União Europeia
UV	UV visível
ZS	Zeta-Sizer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Evolução da alimentação humana	19
1.2 Aditivos alimentares	20
1.3 Aditivos alimentares a base de NPs de sílica amorfa sintética (SAS)	21
1.4 Toxicidade das NPs de SAS	22
1.5 Tubo digestório	25
1.6 Legislação	28
1.7 Falta de padronização entre os estudos de citotoxicidade	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.1.1 Objetivo específico	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Nanomaterial	34
4.2 Caracterização físico-química e dispersão do INS 551	34
4.2.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)	34
4.2.2 Difração de raios-X (DRX)	35
4.2.3 Protocolo de dispersão do INS 551	35
4.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ)	36
4.2.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) do INS 551	37
4.2.6 Avaliação da adsorção proteica	38
4.2.7 Espectroscopia de Absorção de Ultravioleta-Visível (UV-visível)	38
4.3 Cultivo das linhagens celulares	39
4.4 Integridade de Pipetagem	40
4.5 Avaliação de tempo de duplicação celular (PDL)	41
4.6 Ensaio de citotoxicidade após tratamento com o INS 551	42
4.6.1 Avaliação de viabilidade celular por meio de MTT	42
4.6.2 Avaliação da viabilidade celular por impedância elétrica	43
4.6.3 Ensaio de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)	44
4.6.4 Análise de alterações morfológicas e internalização do INS 551	45
4.6.5 Análise de mediadores inflamatórios	46

4.7 Análise dos resultados	46
5. RESULTADOS	47
5.1 Composição elementar do INS 551 de grau alimentar (E551)	47
5.2 Análise da estrutura cristalina do INS 551	48
5.3 Tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) do INS 551	49
5.4 Morfologia do INS 551	53
5.5 Avaliação de adsorção proteica do INS 551	56
5.6 Análise de Absorbância por UV-Visível do INS 551	58
5.7 Ensaio biológicos com o INS 551	59
5.7.1 Integridade de pipetagem	59
5.7.2 Tempo de duplicação celular	60
5.7.3 Viabilidade das células após interação com o INS 551	61
5.7.4 Índice celular após interação com o INS 551	66
5.7.5 Análise de alterações morfológicas e internalização do INS 551	69
5.7.6 Ensaio de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) após interação com INS 551	72
5.7.7 Análise de mediadores inflamatórios após interação com o INS 551	74
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÃO	90
8. BIBLIOGRAFIA.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Evolução da alimentação humana

A nutrição engloba todos os processos responsáveis pelo fornecimento de substâncias essenciais, capazes de fornecer energia a um organismo vivo (ALT *et al.*, 2022). Desde então, ela passou por uma evolução ao longo dos anos estando intimamente ligada às adaptações e inovações tanto tecnológicas quanto culturais (CAPOCASA *et al.*, 2024). Inicialmente, os seres humanos consumiam alimentos em sua forma natural, ou seja, como eram oferecidos pela natureza, dependendo da caça e da coleta para a sua obtenção (ALT *et al.*, 2022; CRITTENDEN *et al.*, 2017).

À medida que o tempo avançou, a forma de consumir alimentos passou por inúmeras transformações impulsionadas por marcos históricos significativos (CAPOCASA *et al.*, 2024). Entre eles, destaca-se o domínio do fogo, um momento crucial para a humanidade. Esse avanço por sua vez, não só ampliou as opções alimentares, como também aumentou a segurança ao eliminar microrganismos presentes nos alimentos (KNORR *et al.*, 2022) e aprimorou a absorção de nutrientes, fator crucial para atividades energeticamente exigentes, como a função cerebral (BADEM, 2024).

A alimentação humana continuou sendo aprimorada de acordo com as necessidades e realidades de cada época, evoluindo até alcançar o estágio atual da nutrição (CAPOCASA *et al.*, 2024; MANNAA *et al.*, 2021). Dentre os marcos significativos desse processo estão a transição da caça e coleta para a agropecuária, que proporcionou maior estabilidade no suprimento alimentar (ALT *et al.*, 2022), bem como o surgimento da fermentação como uma estratégia de "pré-digestão", facilitando a disponibilidade de nutrientes (AMATO *et al.*, 2021); o desenvolvimento de métodos de conservação, como a salga e a defumação; e, posteriormente, a criação dos primeiros sistemas de refrigeração artificial, que revolucionaram a preservação e o armazenamento de alimentos (KUMAR, 2019).

Em paralelo a essa evolução, observou-se o aumento na busca por maneiras de aprimorar as características organolépticas (cor, odor, sabor e textura) e retardar

ainda mais a deterioração dos alimentos. Tais fatores influenciaram diretamente no surgimento dos alimentos processados e dos aditivos alimentares (DEY *et al.*, 2022) (como mostrado na Figura 1).

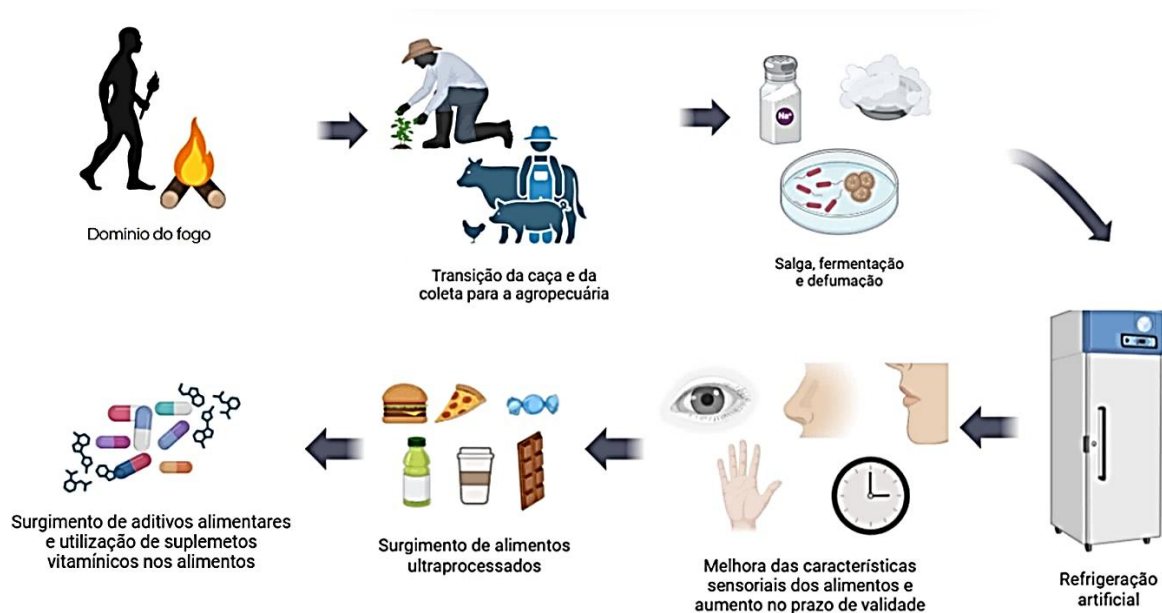


Figura 1. Esquema da evolução da alimentação humana. Observa-se marcos que foram importantes para que a humanidade chegasse na nutrição da atualidade. Fonte: Autor.

1.2 Aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos com o objetivo de aprimorar suas propriedades físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (SILVA *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021) sem, contudo, destinar-se à nutrição. Eles podem ser empregados durante processos diversos, como processamento, fabricação, preparo, tratamento, acondicionamento, armazenamento, embalagem, transporte ou manipulação (ANVISA, 2023b).

De forma geral, os aditivos alimentares podem ser classificados em categorias como: antioxidantes, antiaglomerantes, aromatizantes, conservantes, corantes, edulcorantes, emulsificantes, espessantes e estabilizantes (SHUKLA *et al.*, 2017).

Durante a produção, esses aditivos são utilizados para melhorar as características sensoriais dos alimentos, sendo empregados como agentes

antiaglomerantes, antiespumantes, clarificantes e carreadores de sabor e aroma (GOMES *et al.*, 2018; MEBERT *et al.*, 2017). No que diz respeito ao armazenamento, eles atuam como agentes antibacterianos e antioxidantes, contribuindo para a conservação e prolongamento da vida útil dos produtos. Adicionalmente, têm sido aplicados como matéria-prima no desenvolvimento de embalagens alimentares, com o objetivo de melhorar a preservação dos alimentos (CHEN *et al.*, 2023).

Além dos aditivos alimentares tradicionais, destacam-se os nanoaditivos, que podem ser produzidos na forma de nanopartículas (NPs) ou nanomateriais (NM). O desenvolvimento desses nanoaditivos representou um avanço significativo no setor alimentício, uma vez que, apresentam propriedades físico-químicas diferenciadas em comparação com as mesmas substâncias em dimensões macroscópicas (ALISSON *et al.*, 2019). Essas características incluem uma maior capacidade de interação e internalização em sistemas biológicos (CARDOZA *et al.*, 2022).

Os nanoaditivos foram desenvolvidos com o intuito de superar os desafios e limitações dos aditivos tradicionais, oferecendo maior estabilidade e eficácia, aumento da biodisponibilidade e aplicações multifuncionais, tornando-se uma solução promissora para a evolução da indústria alimentícia (HUANG *et al.*, 2022; SAHANI *et al.*, 2021).

1.3 Aditivos alimentares a base de NPs de sílica amorfa sintética (SAS)

A SAS é o segundo aditivo de maior produção global e é amplamente utilizada na indústria alimentícia como agente antiaglomerante (HEMPT *et al.*, 2021). Identificada como INS 551 no Brasil e como E551 na União Europeia, sua aplicação abrange desde temperos e misturas secas até confeitos e vitaminas (ANVISA, 2023b; HEMPT *et al.*, 2021; SOHAL *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2020). Contudo, a exposição humana a esse aditivo vai além do setor alimentício, pois ele está presente em diversos outros produtos de consumo. Na indústria farmacêutica, a SAS exerce funções multifuncionais como excipiente, atuando como veículo e auxiliando na compressão de comprimidos (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016). Além disso, é utilizada em suplementos alimentares para facilitar a dispersão de vitaminas (JANJUA *et al.*, 2023). Um exemplo significativo da importância farmacêutica da SAS é sua presença

nos comprimidos de ritonavir, componente essencial do antiviral Paxlovid® (PFIZER, 2025).

Embora as agências regulatórias de grande porte, como a *Food and Drug Administration* (FDA), tenham aprovado o uso dessas partículas (FDA, 2025), cresce a preocupação científica quanto aos riscos potenciais à saúde associados às SAS presentes nos alimentos. Isso se deve, em parte, à ausência de regulamentação específica sobre o tamanho e a distribuição granulométrica dessas partículas, o que cria brechas que permitem a presença de NPs nos aditivos alimentares. Um estudo da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) revelou que até 70% da composição desses aditivos pode conter NPs menores que 100 nm (YOUNES *et al.*, 2018).

Essas NPs possuem características que lhes conferem a capacidade tanto de promover efeitos terapêuticos quanto de induzir danos celulares (ZAITER *et al.*, 2022), devido à sua habilidade de interagir com componentes intracelulares e atravessar barreiras biológicas, como a membrana plasmática (BEHZADI *et al.*, 2017). Além disso, o contato das NPs com fluidos biológicos resulta na formação de uma camada proteica na sua superfície, denominada “corona proteica” (GOMES, C.; ENGELMANN, 2018), composta por íons e proteínas. Essa camada facilita a internalização celular das NPs, uma vez que as células reconhecem esses biocomplexos de maneira semelhante a um “cavalo de Troia”, permitindo a entrada dessas partículas em seu interior (RIBEIRO *et al.*, 2016).

1.4 Toxicidade das NPs de SAS

A toxicidade das NPs de SAS é determinada por diversos fatores, podendo estar relacionada às características intrínsecas ou às condições de exposição. Dentre os principais exemplos, estão o tipo específico de NPs, seu tamanho, método de produção (úmido ou térmico), pureza, dose administrada, tipo celular analisado e, em estudos *in vivo*, a via de administração (HUANG *et al.*, 2022; MIAO *et al.*, 2024). Embora anteriormente a sílica amorfa fosse considerada menos prejudicial em

comparação à sílica cristalina, pesquisas apontam que ela pode apresentar níveis de reatividade semelhantes (DAL-CHERI *et al.*, 2021; MARQUES DA SILVA *et al.*, 2022). A representação esquemática da SAS e da sílica cristalina pode ser observada na figura 2.

A sílica cristalina distingue-se por seu arranjo estrutural ordenado, onde os átomos de silício (Si) e oxigênio (O) formam padrões tridimensionais regulares e repetitivos (GOMES *et al.*, 2018). Suas principais formas incluem quartzo, cristobalita, trípoli e tridimita (SINGLA *et al.*, 2022). A exposição prolongada a partículas de sílica cristalina, especialmente pela via respiratória, está associada ao desenvolvimento de doenças graves, como silicose e câncer de pulmão (SILVA *et al.*, 2022). Em contrapartida, a sílica amorfa apresenta um arranjo estrutural desorganizado, no qual os átomos de Si e O não seguem padrões regulares (GOMES *et al.*, 2018). Essa forma pode ser classificada em três categorias principais: natural, subproduto de processos metalúrgicos e sintética (CHEN *et al.*, 2018).

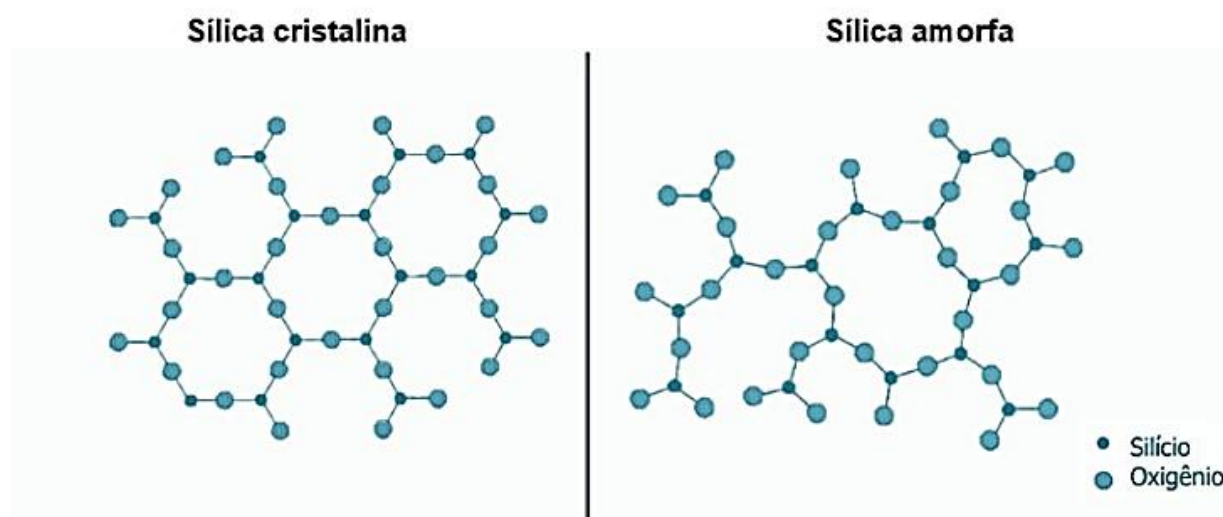


Figura 2. Comparação da organização estrutural entre a sílica amorfa e a sílica cristalina. Fonte: (CALLISTERJUNIOR, 2002 apud COSTA; ALMEIDA; MOREIRA, 2020). Adaptado.

Os mecanismos de toxicidade das NPs de sílica, sejam amorfas ou cristalinas, são multifatoriais (HSU *et al.*, 2021) e ainda não estão completamente compreendidos. Pesquisas demonstraram que as NPs de SAS são capazes de desencadear processos como estresse oxidativo, inflamação, efeitos citotóxicos e

genotóxicos, e morte celular (apoptose); no entanto, as vias de sinalização molecular específicas que mediam esses efeitos permanecem pouco compreendidas. A elucidação dessas vias é fundamental para desenvolver estratégias a fim de mitigar os riscos (ALMEIDA-DA-SILVA *et al.*, 2023; HUANG *et al.*, 2022; OGAWA *et al.*, 2021).

A interação entre as NPs de SAS e os sistemas biológicos, particularmente o sistema imunológico (ERNST *et al.*, 2021), exerce um papel fundamental na indução de inflamação e na liberação de citocinas (PONDMAN *et al.*, 2023). O sistema imunológico inato, especializado no reconhecimento de estruturas em nanoescala, como vírus, também é capaz de detectar e responder às NPs de SAS, ativando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Embora essa resposta seja essencial para a defesa do organismo em diversas situações, ela pode, em alguns casos, levar a uma inflamação exacerbada e contribuir para potenciais efeitos tóxicos das NPs (BARBERO *et al.*, 2017).

Ogawa *et al.* (2020) demonstraram que a ingestão diária de NPs de SAS com tamanho médio de 10 nm é capaz de ativar o inflamassoma “*Apoptosis-associated speck-like containing a CARD*” (ASC) em células imunes da lâmina própria, como macrófagos, mesmo em doses consideradas seguras (aproximadamente 3 mg/kg/dia). Outros estudos corroboram esses achados, indicando que as NPs de SAS podem induzir estresse oxidativo e estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativar o inflamassoma NLRP3 (ALMEIDA-DA-SILVA *et al.*, 2023; LIU *et al.*, 2020).

Apesar das preocupações associadas à toxicidade, as NPs de SAS (SHARMA; JHA, 2020) continuam amplamente empregadas em setores como as indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica, além disso, seu uso crescente na medicina, especialmente em dispositivos médicos (DE MATTEIS, 2017; LEOPOLDO; VECHIO, 2020).

1.5 Tubo digestório

As NPs de SAS já demonstraram potencial para induzir citotoxicidade em células do sistema gastrointestinal. Entretanto, ainda não está claro se essas partículas seriam capazes de causar toxicidade ao tubo digestório em sua totalidade (OGAWA *et al.*, 2021; PIECHULEK *et al.*, 2019).

O tubo digestório é uma estrutura de alta complexidade que se estende da cavidade oral ao esfíncter anal, sendo formado histologicamente por: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Ele possui funções essenciais que incluem o transporte e a absorção de nutrientes, água e eletrólitos, além da eliminação de resíduos metabólicos (FITZPATRICK *et al.*, 2020). Ele também desempenha papéis importantes na defesa imunológica contra patógenos ingeridos, na produção de hormônios que regulam o processo digestivo e na manutenção do equilíbrio ácido-base e hidroeletrolítico do organismo (WOŹNIAK *et al.*, 2021). Portanto, qualquer dano ou perturbação que afete essa estrutura pode resultar em consequências sistêmicas graves, comprometendo a homeostase do corpo (GUILLIAMS, 2019).

A compreensão dos efeitos das NPs de SAS no trato gastrointestinal ainda é limitada. Apesar dessa lacuna, pesquisas têm demonstrado que as NPs de SAS podem interagir com as proteínas de junção oclusiva (*tight junctions*), como a claudina e a ocludina, causando um relaxamento dessa junção, aumentando a permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, ativando processos inflamatórios. Além disso, foi observado que essas partículas são capazes de provocar o rompimento dos filamentos de actina (LAMSON *et al.*, 2019; ZAITER *et al.*, 2022) prejudicando então a absorção nutricional (GUO *et al.*, 2018). No estudo realizado por Piechulek *et al.* (2019), notou-se que as NPs de SAS comprometiam a absorção intestinal de oligopéptidos em nematóides *Caenorhabditis elegans*, resultando em desnutrição nesse modelo experimental.

Sabe-se que o microambiente do trato gastrointestinal pode alterar significativamente as propriedades das NPs de sílica, influenciando sua toxicidade e biodisponibilidade (OGAWA *et al.*, 2021; WINKLER *et al.*, 2016), uma vez que o processo digestivo pode alterar suas propriedades físico-químicas dessas partículas (ZAITER *et al.*, 2022). Estudos demonstram que essas partículas tendem a formar aglomerados em ambientes ácidos, como o estômago, e se dispersam em um

ambiente alcalino como o do intestino (ASAD *et al.*, 2022; SHI *et al.*, 2020; WINKLER *et al.*, 2016). Outro fator a ser considerado é o muco, já que, ele pode fornecer um pouco de proteção para os tecidos (ZAITER *et al.*, 2022). Esses achados ressaltam a necessidade de uma compreensão aprofundada sobre como as condições do trato digestório influenciam as propriedades e os possíveis efeitos tóxicos dessas partículas (ZHOU *et al.*, 2022) (Figura 3).

Outro componente fundamental para a homeostase do tubo digestório é a microbiota (WOŻNIAK *et al.*, 2021). Esse ecossistema é composto por diversos microrganismos que contribuem tanto para a digestão quanto para a resposta imunológica, uma vez que, fortalece a barreira intestinal e exerce efeitos imunomoduladores (LIN *et al.*, 2017; METWALLY *et al.*, 2024).

Algumas evidências indicam que a exposição crônica e o consumo de alguns aditivos alimentares como os corantes, edulcorantes e emulsificantes, pode levar a modulação negativa a composição da microbiota (CAO *et al.*, 2020), contribuindo para o aparecimento de distúrbios metabólicos e até câncer (CUNHA *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023).

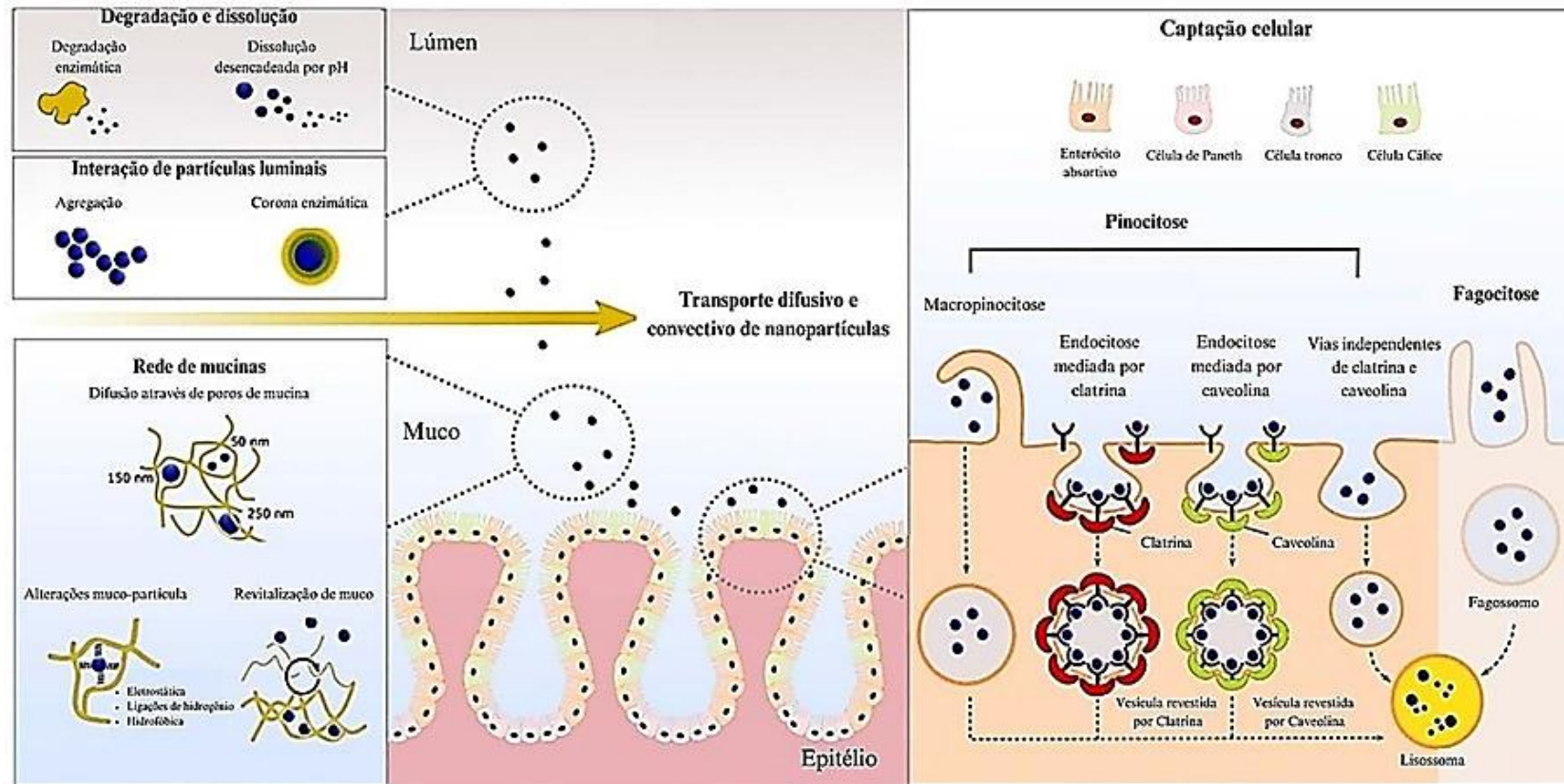


Figura 3. Esquema dos obstáculos fisiológicos enfrentados pelas NPs ao transitarem no trato gastrointestinal. O organismo possui diversos mecanismos de defesa para lidar com as NPs ingeridas. As NPs podem sofrer alterações em sua estrutura devido à degradação enzimática, alterações de pH e à formação de uma camada proteica. Além disso, o muco presente no epitélio intestinal atua como uma barreira física, dificultando a internalização dessas partículas. Os enterócitos absorptivos, induzem a internalização dessas partículas por diferentes vias pinocitóticas, e em seguida, direciona essas partículas para os lisossomos para serem degradadas. Tais partículas também podem ser eliminadas por células do sistema imune, por fagocitose (ASAD *et al.*, 2022).

1.6 Legislação

Atualmente, não há uma regulamentação específica para produtos que contenham NPs (ENGELMANN; LEAL, 2020). No entanto, há um consenso entre as organizações científicas de que as NPs podem apresentar um impacto significativo na saúde humana, destacando assim a necessidade de investigar a periculosidade de cada NPs antes de serem utilizadas (CARDOZA *et al.*, 2022).

Segundo a EFSA, as informações disponíveis sobre a toxicidade oral da SAS são insuficientes, impedindo uma avaliação de risco confiável (YOUNES *et al.*, 2018) e impossibilitando a definição de uma ingestão diária aceitável (ADI) como "não especificada" (HEMPT *et al.*, 2020).

O FDA permite que os produtos alimentícios contenham até 2% de dióxido de silício (SiO₂) em peso do produto de consumo (YOUNES *et al.*, 2018). No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 239, de 26 de julho de 2018, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autoriza o uso do SiO₂ em diversas categorias de alimentos, incluindo cacau e chocolate, confeitaria, suplementos alimentares e produtos farináceos. Os limites máximos variam conforme a categoria, mas, em geral, são de 10 g/kg. O uso da sílica em nanoescala ainda está sob avaliação por autoridades sanitárias, devido a possíveis diferenças na absorção e nos efeitos biológicos. Entretanto, não há critérios específicos estabelecidos para a granulometria e o tamanho das partículas (CONASS, 2018).

1.7 Falta de padronização entre os estudos de citotoxicidade

Apesar de existirem diversos estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliem a segurança das NPs de SAS, os resultados são conflitantes (MCCLEMENTS *et al.*, 2016; SOHAL *et al.*, 2018). Um dos principais fatores que contribuem para essa inconsistência é a utilização, em muitos trabalhos, de formas de SAS ou cristalina que não correspondem às aplicadas como aditivos alimentares (INS 551).

Essas diferenças nas propriedades físico-químicas resultam em uma escassez de informações específicas sobre a toxicidade da SAS de grau alimentício (YU *et al.*, 2020).

As NPs de SAS destinadas ao uso alimentar apresentam características distintas em relação a materiais de referência amplamente empregados em estudos toxicológicos *in vitro*, como a NM-200 e a NM-203 (MURUGADOSS *et al.*, 2017). Entre essas diferenças, destacam-se aspectos como pureza, estrutura, funcionalidade e avaliação toxicológica, sendo a pureza e a composição os fatores mais relevantes (ANVISA, 2020). Enquanto as SAS alimentícias são produzidas sob rigorosos critérios de fabricação, que visam minimizar resíduos metálicos e compostos potencialmente tóxicos (YOUNES *et al.*, 2018), a NM-200 e a NM-203, desenvolvidas para aplicações industriais, podem apresentar maior quantidade de grupos silanois livres na superfície, aumentando sua reatividade (BRAND *et al.*, 2021).

Outra diferença importante está no tamanho das partículas. O NM-200 e o NM-203 são compostas majoritariamente por partículas com diâmetro inferior a 100 nm (COMISSÃO EUROPEIA, 2013). Enquanto as NPs de SAS alimentícias apresentam uma distribuição de tamanho mais ampla (maiores que 100 nm). Essa distinção é significativa, pois partículas menores possuem maior propensão a interagir com sistemas biológicos, o que pode influenciar sua biodisponibilidade e potenciais efeitos toxicológicos (ASAD *et al.*, 2022; MURUGADOSS *et al.*, 2017).

Além dessas diferenças, a falta de padronização tanto na caracterização quanto nos testes toxicológicos com NPs representa outra limitação relevante (BRAND *et al.*, 2021; SOHAL *et al.*, 2020). Discrepâncias nos desenhos experimentais, incluindo distribuição de tamanho de partícula, química de superfície e sistemas de teste, contribuem para achados conflitantes e dificultam a avaliação dos efeitos biológicos das NPs de SAS (BRAND *et al.*, 2021).

Ao fazer uma comparação entre o estudo realizado por (TARANTINI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013), pode-se observar resultados divergentes. No estudo de TARANTINI *et al.* (2015), foi possível observar uma queda na viabilidade celular na linhagem Caco-2, células epiteliais do intestino grosso (cólon), após 24 horas (h) de exposição a concentrações a partir de 32 µg/mL de NPs de SAS; estas apresentaram uma viabilidade de apenas 20% quando expostas a 256 µg/mL. Por

outro lado, WANG *et al.* (2013) utilizaram a mesma linhagem e tempo de exposição, porém não observaram efeitos tóxicos mesmo em concentrações de 500 µg/mL.

Diante disso, fica evidente que a ausência de padronização metodológica, aliada ao uso de materiais que não refletem a composição real dos aditivos alimentares (como por exemplo o INS 551), gera incertezas significativas. A falta de clareza quanto à origem e às especificações desses materiais compromete a extrapolação dos resultados toxicológicos para exposições dietéticas reais. Portanto, torna-se urgente estabelecer protocolos de teste padronizados que considerem as características do material, as condições de exposição e os sistemas biológicos adequados, garantindo assim resultados mais confiáveis e comparáveis para a avaliação da segurança da SAS de grau alimentício.

2. JUSTIFICATIVA

As SAS de grau alimentar, conhecidas como INS 551, têm sido amplamente utilizadas, especialmente na indústria alimentícia (YU *et al.*, 2020). Essa ampla aplicação decorre da capacidade do INS 551 de melhorar características organolépticas e prolongar a vida útil dos alimentos (DEY *et al.*, 2022). No entanto, persiste uma lacuna significativa no conhecimento científico acerca dos impactos deste aditivo na saúde humana. Grande parte dos estudos disponíveis avaliou outros tipos de sílica, gerando dados frequentemente pouco confiáveis e, por vezes, contraditórios. Essa falta de clareza sobre os efeitos potenciais do INS 551 representa uma relevante preocupação no âmbito da segurança alimentar e saúde pública (BRAND *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, esta dissertação teve como objetivo principal fornecer evidências científicas robustas sobre os possíveis efeitos das NPs de SAS (que vamos passar a chamar somente de INS 551) em células do tecido gastrointestinal humano, com foco nos modelos celulares FGH (fibroblastos gengivais humanos) e Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colorretal). Além disso, buscou-se padronizar os ensaios de citotoxicidade, promovendo maior reprodutibilidade e preditibilidade nos resultados. Espera-se, assim, contribuir significativamente para a garantia da segurança e qualidade dos alimentos consumidos pela população.

Para garantir a qualidade dos resultados, o projeto foi conduzido em conformidade com normas internacionais. No que se refere à caracterização das NPs de SAS, seguimos as normas ISO 19337 (Nanotecnologias — Características das suspensões de trabalho de nano-objetos para ensaios *in vitro* destinados a avaliar a toxicidade intrínseca dos nano-objetos) para caracterização das nanopartículas, ISO 22412:2017 (Análise de tamanho de partículas — Espalhamento dinâmico de luz (DLS)) para a análise do tamanho das nanopartículas e ISO 9276-1 (Representação dos resultados da análise de tamanho de partículas — Parte 1: Representação gráfica). Para os ensaios de citotoxicidade adotou-se a norma ABNT NBR ISO 20391-2 (Biotecnologia — Contagem celular — Parte 2: Desenho experimental e análise estatística para quantificar o desempenho de métodos de contagem) e a ISO 10993-

5 (Avaliação biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Ensaio de citotoxicidade in vitro). Essa adoção normativa reforça a robustez do procedimento e a validade dos resultados obtidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade do INS 551 sobre células do tubo digestório.

3.1.1 Objetivo específico

- I. Caracterização físico-química do INS 551;
- II. Análise de adsorção proteica, após exposição ao INS 551 aos meios de cultivo;
- III. Avaliação da viabilidade das linhagens celulares após exposição ao INS 551;
- IV. Análise morfológica das linhagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após a exposição ao INS 551;
- V. Análise de internalização do INS 551 nas linhagens celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- VI. Análise de secreção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após exposição ao INS 551;
- VII. Avaliação de secreção de citocinas inflamatórias após exposição ao INS 551;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Nanomaterial

Para a execução deste projeto, foi utilizada a SAS de grau alimentício. O material foi obtido por meio de doação da empresa Sagaragi Indústria e Comércio LTDA (Santo Amaro, São Paulo, Brasil), onde é comercializado sob o nome PERKASIL® SM 660 (U). No restante do texto, este aditivo será referido apenas como INS 551.

4.2 Caracterização físico-química e dispersão do INS 551

A caracterização química elementar do aditivo foi realizada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), enquanto a caracterização da fase cristalina foi conduzida por meio do ensaio de difração de raios X (DRX).

A fim de determinar o tamanho, a morfologia e o estado de agregação das partículas, foram empregadas as técnicas de MEV e MET.

4.2.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Para a caracterização elementar, a amostra (em pó) foi colocada sobre stubs metálicos, revestidos com fita de carbono condutora; tal revestimento tem como intuito minimizar a interferência eletrostática, assegurando assim uma boa condutividade elétrica.

Os suportes foram, então, inseridos na câmara de vácuo do MEV FEI Magellan 400 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a formação do vácuo, escolheu-se o local da amostra que seria bombardeada pelo feixe de elétrons com uma voltagem de aceleração de 15 kV, sendo suficiente para excitar os átomos presentes na superfície da amostra. A interação do feixe de elétrons com a amostra resultou na emissão de raios-X característicos, que foram detectados por um

sistema integrado de EDS acoplado ao MEV. Os dados obtidos foram processados com o software AZtecEnergy (Oxford Instruments, Reino Unido), que permitiu a identificação e a atribuição dos elementos com base nas assinaturas espectrais únicas de cada um.

4.2.2 Difração de raios-X (DRX)

Nesse ensaio, o INS 551, em pó, foi colocado em um porta-amostra com cavidade, compactado e cuidadosamente nivelado, a fim de criar uma superfície plana, garantindo então uma difração uniforme dos feixes. Em seguida, a amostra foi inserida em um difratômetro D8 Focus (Bruker AXS, Alemanha), onde um feixe de fótons, com radiação Cu-K α ($\lambda \approx 1.5406 \text{ \AA}$), incidiu sobre a amostra. Os dados de difração foram processados e os gráficos gerados utilizando o software Origin (OriginLab, EUA).

4.2.3 Protocolo de dispersão do INS 551

Para a utilização do INS 551 nos ensaios de exposição *in vitro*, foi necessário realizar a dispersão em água ultrapura, seguida da diluição em meios de cultura específicos para cada linhagem celular.

A caracterização das dispersões foi conduzida por espalhamento dinâmico de luz (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments GmbH), a fim de avaliar a distribuição hidrodinâmica das partículas. Para o preparo das soluções de INS 551, 50 mg do pó foram pesados em balança analítica de alta precisão (Sartorius AG, Göttingen, Alemanha) e suspensos em 50 mL de água ultrapura, resultando em uma concentração inicial de 1 mg/mL.

A decisão de desenvolver dois protocolos distintos de dispersão (com e sem sonicação por ultrassom) teve como objetivo gerar suspensões de INS 551 em diferentes estados de aglomeração. Esta abordagem é crucial para mimetizar a variabilidade de condições encontradas em estudos toxicológicos e de aplicação,

onde o material pode ser submetido ou não a processos energéticos de dispersão. A Dispersão A (sonicada) visa representar o estado mais monodisperso e com menor tamanho hidrodinâmico, comumente almejado em estudos de nano-biointeração para avaliar os efeitos intrínsecos das INS 551. Já a Dispersão B (apenas agitada) simula um estado de maior aglomeração, mais representativo de como o material poderia se comportar em uma suspensão preparada de forma menos energética, permitindo assim investigar o impacto dos agregados na resposta biológica. Dessa forma, a comparação entre os dois grupos permite uma avaliação toxicológica mais abrangente e realista.

Na Dispersão A, após a homogeneização inicial em agitador magnético C-MAG HS 4 (IKA, Alemanha) por 10 minutos (min) à temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), com o objetivo de melhorar a dissolução do aditivo e garantir maior homogeneidade da amostra, a barra magnética foi removida. Em seguida, a suspensão foi submetida à dispersão ultrassônica direta com sonificador de mesa modelo Q700 (Qsonica, EUA) equipado com uma microsonda de titânio de $\frac{1}{8}$ polegada de diâmetro. O processo foi conduzido com uma potência de saída nominal de 32 W, em modo pulsado (ciclo de 8 segundos (s) ligados / 2 s desligados) por 15 min, utilizando banho de gelo para evitar superaquecimento. Esse protocolo de sonicação foi previamente estabelecido e validado pelo grupo de pesquisa (DAL-CHERI *et al.*, 2025).

Na Dispersão B, a suspensão foi apenas submetida à agitação magnética, nas mesmas condições (10 min à temperatura ambiente), sem o processo subsequente de sonicação. O tamanho médio das NPs de SAS foi determinado imediatamente após cada protocolo de dispersão.

4.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ)

O diâmetro hidrodinâmico médio (d , nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (ζ , mV) do aditivo INS 551, na concentração de 1 mg/mL, foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments GmbH, Reino Unido). As análises foram conduzidas em três condições

experimentais: água ultrapura (PURELAB Option Q, ELGA LabWater, Reino Unido), Dulbecco's Modified Eagle Medium com alta concentração de glicose (DMEM High Glucose, Sigma-Aldrich, EUA) e Dulbecco's Modified Eagle Medium com baixa concentração de glicose (DMEM Low Glucose, Sigma-Aldrich, EUA). Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, EUA).

As medições DLS e de PZ foram realizadas em triplicata, antes e após os processos de dispersão (A e B). As análises foram feitas a uma temperatura controlada de 25 °C, utilizando cubetas descartáveis de poliestireno (10 mm de caminho óptico).

4.2.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) do INS 551

Para a avaliação da morfometria do INS 551, as análises foram realizadas por meio de MET. Para a preparação das amostras, foram depositadas alíquotas de 5 µL da suspensão de INS 551 (1 mg/mL) em grades de cobre de 300 mesh revestidas com Formvar, as quais foram deixadas para secar ao ar em temperatura ambiente. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI, Países Baixos), operado a 120 kV. Assim como nas análises realizadas por DLS, as amostras foram analisadas sob as seguintes condições experimentais: água ultrapura e meios de cultivo suplementados (DMEM Low Glucose e DMEM High Glucose), antes e após o processo de dispersão. No total, foram examinadas oito grades.

Já para a avaliação morfológica do INS 551, foram empregadas análises por MEV. Para a preparação, 2 mg de INS 551 foram pesados em balança analítica (Sartorius AG, Göttingen, Alemanha) e dispersos em 2 mL de água ultrapura, resultando em suspensão a 1 mg/mL. A solução foi homogeneizada por aspiração e dispensação repetidas com uma micropipeta de 1 mL (Eppendorf®, Alemanha), seguida de sonicação em banho ultrassônico por 10 min, visando reduzir a aglomeração e facilitar a visualização da morfologia das partículas.

Para o preparo das amostras para MEV, lâminas de silício previamente limpas com etanol e água ultrapura foram montadas em suportes de alumínio (stubs) utilizando fita de carbono. Pequenos volumes da suspensão foram depositados sobre as lâminas, que foram então mantidas em dessecador até a secagem completa (período ≥ 1 h).

4.2.6 Avaliação da adsorção proteica

Realizou-se a análise do perfil proteico adsorvido na superfície do INS 551, conhecida como corona proteica. Para esse ensaio, o INS 551 foi analisado em água ultrapura após o processo de sonicação descrito no item 4.2.3. Prepararam-se diluições no meio de cultura DMEM High Glucose, suplementado com 10% de SFB, e as amostras foram homogeneizadas por meio de vórtex.

Após a incubação de 1 h, as soluções foram centrifugadas a 4.400 rpm por 1 h, ressuspensão em PBS 0,01 M e armazenadas em congelamento até a realização do ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para a realização da análise por SDS-PAGE, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas a uma nova centrifugação a 5.000 rpm. Em seguida, foram ressuspensão em tampão de amostra e aquecidas a 100 °C por 5 min em um termo-bloco Kasvi.

Feito isso, as amostras e o padrão de peso molecular da BioRad foram submetidos a uma corrida de eletroforese em gel de bis-poliacrilamida a 7,5% a 120 V a fim de separar as proteínas por peso molecular.

Posteriormente, as bandas proteicas serão identificadas por espectrometria de massa.

4.2.7 Espectroscopia de Absorção de Ultravioleta-Visível (UV-visível)

Essa técnica foi realizada para investigar as propriedades ópticas do INS 551. Para isso, o pó foi dissolvido em água ultrapura e passou pelo processo de

sonicação; esse preparo seguiu o protocolo que foi estabelecido no item 4.2.4. Foi colocado 1 mL de solução em uma cubeta de quartzo. A absorbância foi medida nos comprimentos de onda na faixa de 200 a 800 nm, a uma resolução de 1 nm. Para esse ensaio foi utilizado o espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA).

4.3 Cultivo das linhagens celulares

Para os ensaios de citotoxicidade, duas linhagens celulares foram utilizadas: fibroblastos gengivais humanos (FGH, ATCC CRL-2014™) e células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2, ATCC HTB-37™). Ambas as linhagens foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e armazenadas no biobanco do Laboratório de Biologia de Células Eucariontes (LABIO) do Inmetro.

As células FGH foram cultivadas em meio DMEM High Glucose, enquanto as células Caco-2 foram cultivadas em meio DMEM Low Glucose. Ambos os meios foram suplementados com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina (PS) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA).

As culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂, sendo monitoradas por meio de um microscópio óptico invertido de contraste de fase (ZEISS™ Primo Vert™) até atingirem uma confluência de 70-80%. A pureza das culturas celulares foi garantida por meio de testes para a detecção de micoplasma, bactérias e fungos antes do início dos experimentos.

Para certificar a ausência de micoplasma, foram realizados testes de bioluminescência utilizando o kit Myco Alert Mycoplasma Detection (Lonza, Suíça) e um luminômetro Lucetta (Lonza). A ausência de bactérias e fungos foi verificada por ensaios de esterilidade, conforme a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira, utilizando os seguintes meios: Caldo Tioglicolato (TIO) e Caldo Casoy (TSB), sempre utilizando controle negativo. O sobrenadante da cultura celular foi inoculado em cada meio, TIO e TSB, diluindo a amostra nos meios contidos em tubos de ensaio de vidro. Os tubos foram incubados nas seguintes temperaturas em condições aeróbias por 14 dias:

22,5°C ± 2,5°C, TSB e 32,5°C ± 2,5°C, TIO. Durante os 14 dias, a análise foi acompanhada para observação e interpretação dos resultados. Ao final do período de incubação foi que não houve contaminação microbiana.

4.4 Integridade de Pipetagem

Essa análise foi realizada previamente aos ensaios de citotoxicidade com o objetivo de verificar a precisão e a reprodutibilidade na preparação manual das diluições celulares. O procedimento foi fundamentado em protocolo previamente estabelecido pelo grupo (VESCHI *et al.*, 2024) e adaptado às condições experimentais do presente estudo e executado em conformidade com a norma ABNT NBR ISO 20391-2, assegurando a robustez e a adequação metodológica.

Para a execução do ensaio, utilizou-se uma balança analítica calibrada (AUW 220D, Shimadzu, Tóquio, Japão) para a determinação das massas correspondentes à suspensão celular (m_1) e ao diluente (m_2), garantindo a confiabilidade das medições gravimétricas. Foram então preparados, em triplicata, os volumes de células e de meio de cultura correspondentes às diluições propostas ($1,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^4$; $3,0 \times 10^4$; $4,0 \times 10^4$; $5,0 \times 10^4$ células). As diluições foram realizadas em DMEM High Glucose para a linhagem FGH e em DMEM Low Glucose para a linhagem Caco-2, ambos suplementados com 10% de SFB.

Para o cálculo da fração de diluição pré-avaliada, foi estimada por meio de dois métodos complementares:

I. Estimativa gravimétrica direta: foi calculada considerando a razão entre a massa da suspensão celular e a soma das massas da própria suspensão e do diluente:

$$df_{(gravimétrico)} = \frac{m_1}{m_1 + m_2}$$

II. Modelo de regressão linear com erro ajustado, no qual a fração de diluição experimental $df_{(pré-avaliado)}$ é descrita pela seguinte equação:

$$df_{(pré-avaliado)} = \beta_{pipetagem} \times df_i + \epsilon_{ij}$$

Onde:

- m_1 é a massa da amostra a ser diluída (suspensão celular);

- m_2 é a massa do diluente (DMEM contendo 10% de SFB);
- $\beta_{pipetagem}$ é uma constante determinada pelo coeficiente angular da curva referente à fração de diluição alvo (df_i);
- ϵ_{ij} representa o desvio de $df_{(pré-avaliado)}$ em relação à tendência proporcional;

Todas as avaliações foram realizadas sob condições controladas de temperatura (~20–25 °C) e umidade relativa (45–65%), minimizando potenciais interferências ambientais.

4.5 Avaliação de tempo de duplicação celular (PDL)

O tempo de duplicação celular (*Population Doubling Level - PDL*) é um ensaio imprescindível em estudos de citotoxicidade, já que ele permite uma percepção do impacto que o composto analisado, neste caso o INS 551, pode causar no processo de divisão celular ao longo do tempo.

No ensaio de PDL avalia-se a taxa de proliferação celular, fornecendo dados fundamentais como: viabilidade e comportamento do crescimento das células após a exposição ao INS 551. Para esse ensaio, as linhagens FGH e Caco-2 foram plaqueadas em placas de 48 poços (área de crescimento celular de 0,84 cm²), com densidades de $3,05 \times 10^4$ células/cm².

Após 24 h do plaqueamento, as células foram expostas ao INS 551 nas concentrações de 19,82 µg/mL e 200 µg/mL, sendo estas as concentrações mais baixas e mais altas do estudo, respectivamente. Como controle positivo utilizou-se DMSO (2,5%), diluído em meio de cultivo suplementado com 10% de SFB. Feito isso, as células foram contadas nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h após a exposição.

As contagens celulares foram feitas de forma manual, sendo utilizada a câmara de Neubauer, pela exclusão de azul de Trypan a 0,4%. Tais contagens foram realizadas em triplicata para cada condição. Posteriormente, os cálculos foram feitos utilizando a fórmula a seguir:

$$PDL: = 3,322 * (\text{LOG (células totais)} - \text{LOG (células vivas plaqueadas)})$$

Na qual, células totais representam células vivas e células mortas. Sendo possível avaliar o impacto do INS 551 na duplicação e na viabilidade celular.

4.6 Ensaio de citotoxicidade após tratamento com o INS 551

A investigação das respostas tecido-específicas ao INS 551 foi conduzida por meio da análise de citotoxicidade nas linhagens celulares FGH e Caco-2. As linhagens foram expostas ao aditivo em sete concentrações progressivas (19,82; 29,13; 42,83; 62,96; 92,55; 136,05 e 200 µg/mL) durante 72 h. Essas concentrações foram estabelecidas utilizando um fator de diluição geométrico de 1,47, seguindo as orientações estipuladas na norma ISO 10993-5:2009 (Anexo A, seção A.2.3.5.2) para ensaios de citotoxicidade. A seleção da faixa de concentrações foi fundamentada em dois critérios principais: (1) contemplar níveis inferiores ao NOAEL (*no observed adverse effect level* – nível de efeito adverso não observado) relatado em estudos prévios (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016; HEMPT et al., 2021; ZAITER et al., 2022); e (2) incluir concentrações conhecidas por induzir efeitos citotóxicos em modelos *in vitro* semelhantes (TARANTINI et al., 2015; WANG et al., 2013). Como controle positivo para indução de citotoxicidade, empregou-se dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) na concentração de 2,5% (v/v).

4.6.1 Avaliação de viabilidade celular por meio de MTT

O método de contato direto foi adotado, seguindo um protocolo baseado na norma ISO 10993-5:2009. Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, NY, EUA) na densidade de $3,03 \times 10^4$ células/cm² e mantidas por 24 h a 37 °C e a 5% CO₂. Após adesão *overnight* as células foram expostas ao INS 551 em diferentes condições experimentais: Dispersão A e Dispersão B. As concentrações avaliadas variaram de 19,82 a 200 µg/mL.

Para as linhagens Caco-2 e FGH, os tratamentos foram conduzidos por 72 h, enquanto para fibroblastos murinos L929 (ATCC CCL-1™), o tempo de exposição foi

de 24 h, conforme recomendações da norma ISO 10993-5:2009.

Como controle positivo de citotoxicidade, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações para L929; foi adotada a concentração de 7,5% (v/v), enquanto para Caco-2 e FGH foi empregada 2,5% (v/v). As concentrações utilizadas foram estabelecidas com base em ensaios preliminares de curva dose-resposta, de modo a selecionar valores que resultassem em cerca de 30% a 50% de morte celular

Após o período de exposição, as células foram lavadas e incubadas com solução de MTT (1 mg/mL) por 2 h a 37 °C em ambiente protegido da luz. Em seguida, o reagente foi removido e adicionaram-se 100 µL de 2-propanol ($\geq 99,9\%$, Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em cada poço a fim de solubilizar os cristais de formazan. As placas foram submetidas a agitação orbital (Unishaker Digital Orbital, Uniscience Corp., EUA) por 15 min e mantidas em repouso por mais 30 min antes da leitura. A absorbância foi medida em 570 nm utilizando um espectrofotômetro (Synergy H4 Hybrid, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). Os resultados foram normalizados em relação ao controle não tratado e analisados no software GraphPad Prism 9 (San Diego, Califórnia, EUA).

4.6.2 Avaliação da viabilidade celular por impedância elétrica

O ensaio foi conduzido no equipamento xCELLigence RTCA SP (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, EUA), permitindo a avaliação em tempo real da viabilidade, adesão e proliferação celular. Esse método baseia-se na medição da resistência elétrica (impedância), que varia conforme as células aderem e proliferam sobre microeletrodos de ouro fundido presentes na superfície inferior de placas especiais de 96 poços (E-Plate View xCELLigence RTCA SP). A impedância registrada é convertida em um índice adimensional denominado *Cell Index* (CI). Antes do início do ensaio, a integridade das conexões dos poços foi verificada com o uso de uma placa de verificação, garantindo assim a confiabilidade dos dados obtidos. Somente após a confirmação do funcionamento adequado das conexões, o experimento foi iniciado.

Inicialmente foram adicionados 50 μL de meio de cultura suplementado com SFB, utilizando DMEM High Glucose para as células FGH e DMEM Low Glucose para as células Caco-2, seguido da inserção da placa na estação xCELLigence, a fim de estabelecer a linha de base da impedância. Posteriormente, as células foram semeadas com densidades de $4,68 \times 10^4$ células/ cm^2 para FGH e $6,25 \times 10^4$ células/ cm^2 para Caco-2, atingindo um volume final de 150 μL por poço. Em seguida, as placas foram incubadas em condições padrão durante a noite para possibilitar a adesão inicial das células.

Na manhã seguinte, iniciou-se a exposição, que se estendeu por 96 h, durante as quais a impedância foi monitorada continuamente, com registros realizados a cada hora.

4.6.3 Ensaio de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)

Para a realização deste ensaio, as linhagens celulares FGH e Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, NY, EUA) com densidade de $3,03 \times 10^4$ células/ cm^2 . Após a adesão celular *overnight*, as culturas foram expostas ao INS 511 nas concentrações de 19,82 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ por 72 h. Como controles, foram utilizadas células não expostas, consideradas controle negativo, e DMSO a 35%, definido como controle positivo com base em ensaios preliminares de curva dose-resposta.

O experimento foi realizado utilizando o kit fluorimétrico MAK143 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que contém um sensor fluorogênico capaz de reagir com ROS, gerando um produto fluorescente cuja intensidade é proporcional à quantidade dessas espécies nas células vivas. O ensaio foi conduzido conforme as recomendações do fabricante.

Após 72 h de exposição, 50 μL de cada poço foi descartado, e em seguida, 20 μL de Master Reaction Mix contendo o sensor fluorogênico foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada por 1 h em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO_2 e protegida da luz.

Posteriormente, a intensidade de fluorescência foi medida com excitação em 490 nm e emissão em 585 nm, utilizando um espectrofotômetro (SynergyH4 Hybrid

Reader, Biotek, EUA). Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 9 (San Diego, Califórnia, EUA).

4.6.4 Análise de alterações morfológicas e internalização do INS 551

As linhagens celulares Caco-2 e FGH foram cultivadas em experimentos independentes, semeadas à densidade de $3,03 \times 10^4$ células/cm², e incubadas *overnight*. Para os ensaios de MEV, as células foram cultivadas sobre lâminas de vidro circulares (15 mm de diâmetro, Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) posicionadas em placas de 24 poços (Corning, NY, EUA), enquanto para o MET foram utilizadas garrafas de cultura de 75 cm² (Corning, NY, EUA). Após 24 h, as culturas foram expostas ao INS 551 nas concentrações de 19,82 µg/mL e 200 µg/mL, durante 72 h.

Para a análise morfológica por MEV, as lamínulas foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e fixadas em glutaraldeído a 2,5% preparado no mesmo tampão, por 1 h à temperatura ambiente (~25 °C). Em seguida, foram submetidos a lavagem e pós-fixação com ferrocianeto de potássio a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e tetróxido de ósmio a 1% (EMS, Hatfield, PA, EUA) por 40 min, seguidas de três lavagens adicionais em tampão cacodilato 0,1 M. O processo de desidratação foi realizado em série crescente de etanol (30–100%, VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil), seguido de secagem no ponto crítico (Leica CPD030). Posteriormente, as amostras foram montadas em stubs utilizando fita de carbono, recobertas com platina por sputtering (Leica EM SCD500) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Magellan 400 SEM (FEI, Eindhoven, Holanda).

A internalização do INS 511 foi investigada por MET em células cultivadas nas mesmas condições iniciais. As amostras foram fixadas em solução modificada de Karnovsky por 2 h à temperatura ambiente (~25 °C). Após a fixação, as células foram removidas delicadamente por raspagem com rodinho de célula, transferidas para tubos cônicos de 15 mL e centrifugadas por 10 min a 1500×g. Em seguida, foram realizadas três lavagens com tampão cacodilato 0,1 M, repetindo-se o processo de centrifugação nas mesmas condições.

As amostras foram então submetidas à pós-fixação em ferrocianeto de

potássio a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e tetróxido de ósmio a 1% (EMS, Hatfield, PA, EUA) por 40 min, seguidas de três lavagens adicionais em tampão cacodilato 0,1 M. O processo de desidratação foi realizado em série crescente de acetona (30–100%) contendo 1% de acetato de uranila (Sigma-Aldrich), e posteriormente em série crescente de etanol (30–100%). Após a desidratação, os espécimes foram incluídos em resina Epon 812 (EMS, Hatfield, PA, EUA).

Cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm foram obtidos em ultramicrótomo e analisados no microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit BioTwin G2 (FEI, Hillsboro, OR, EUA). Para esta análise, foram examinadas pelo menos dez células por grupo experimental (controle e 200 µg/mL).

4.6.5 Análise de mediadores inflamatórios

Para determinar os mediadores inflamatórios secretadas pelas células FGH e Caco-2, após exposição ao INS 551 foi utilizado o kit multiplex (Luminex Xmap, EUA) para os seguintes analitos: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, bFGF, GCSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF. Esse ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante e a leitura será feita no equipamento Bio-Plex Magpix (Luminex Xmap, EUA). Para isso, foi necessário coletar o sobrenadante das células após a exposição, esse sobrenadante foi armazenado a -20 °C até o dia da análise.

4.7 Análise dos resultados

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística descritiva e expressos como média \pm desvio-padrão. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism. Após a verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, aplicou-se ANOVA seguida do teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ como nível de significância. Para comparações diretas entre pares, utilizou-se o teste t de Student não pareado, quando apropriado.

5. RESULTADOS

5.1 Composição elementar do INS 551 de grau alimentar (E551)

Nesta dissertação, utilizamos o INS 551 para avaliar seus possíveis impactos em células do trato intestinal. Antes da exposição celular, foi realizada a caracterização detalhada do material a fim de confirmar sua composição química e suas propriedades físico-químicas. A primeira etapa dessa caracterização foi a análise por EDS acoplada ao MEV, com o objetivo de identificar a composição elementar do material (Figura 4).

A técnica de EDS permitiu a identificação dos elementos químicos presentes na amostra, confirmando a predominância de O e Si, característicos consistentes com SiO_2 (Figura 4). A análise quantitativa revelou que a amostra possuía uma pureza elevada de 100%, em conformidade com as especificações do fabricante.

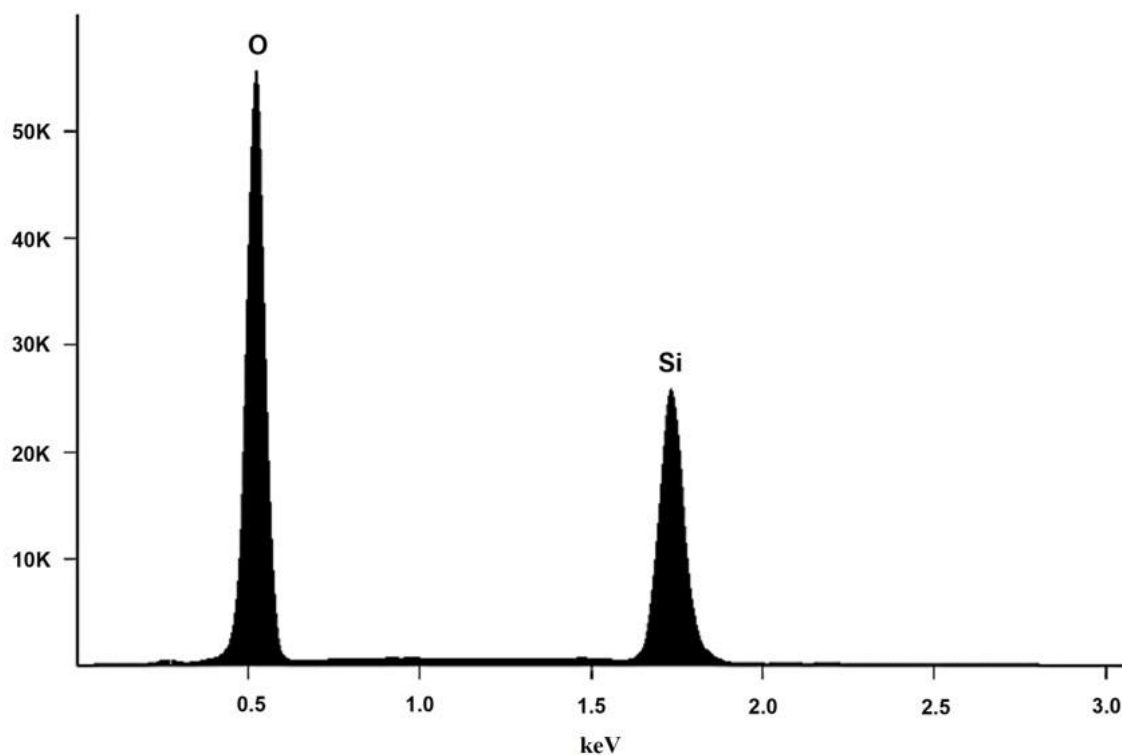


Figura 4. A composição elementar do INS 551: A composição foi confirmada por EDS, evidenciando a presença dos elementos O e Si.

A ausência de contaminantes reforça a adequação do material para uso em estudos de segurança alimentar (Figura 5).

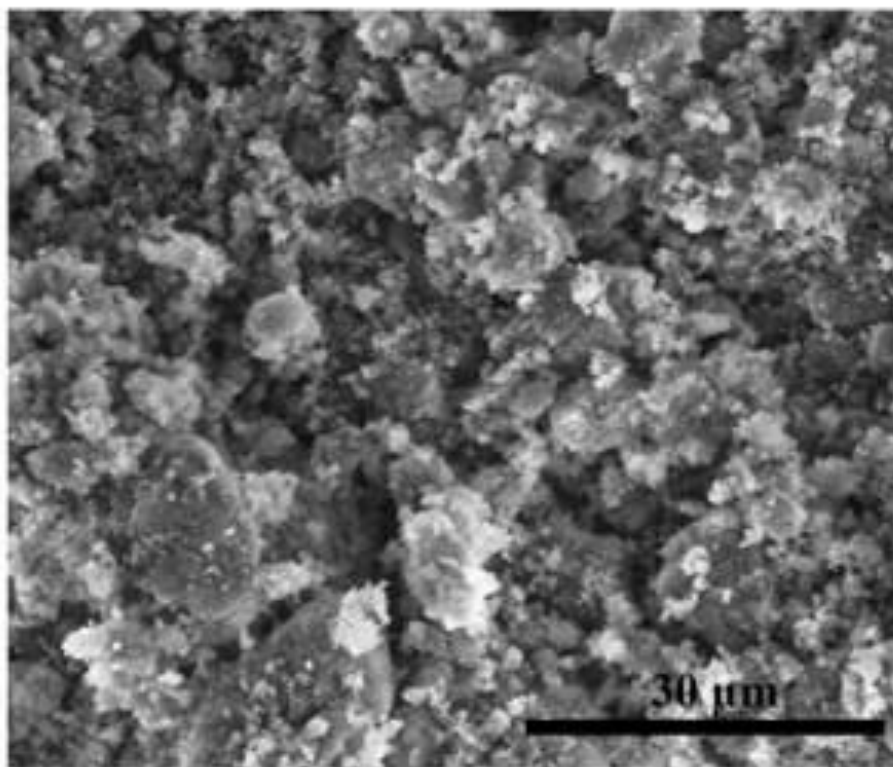


Figura 5. Micrografia de MEV do aditivo INS 551. A imagem mostra a formação de agregados com superfícies irregulares e ausência de contaminantes visíveis

5.2 Análise da estrutura cristalina do INS 551

Para confirmar a estrutura cristalina do material, foi realizada a análise por DRX, permitindo a identificação do padrão de organização atômica do INS 551. Os resultados indicaram a ausência de picos característicos de estruturas cristalinas bem definidas, evidenciando que a amostra apresenta uma natureza amorfa. Esse comportamento foi observado pelo perfil de difração com um halo difuso entre 15° e 32° (2θ), típico de materiais amorfos.

A ausência de padrões de cristalização confirma que a amostra utilizada é compatível com os padrões exigidos para aditivos alimentares. Os picos de difração obtidos estão representados na Figura 6, ilustrando o padrão amorfo característico da amostra.

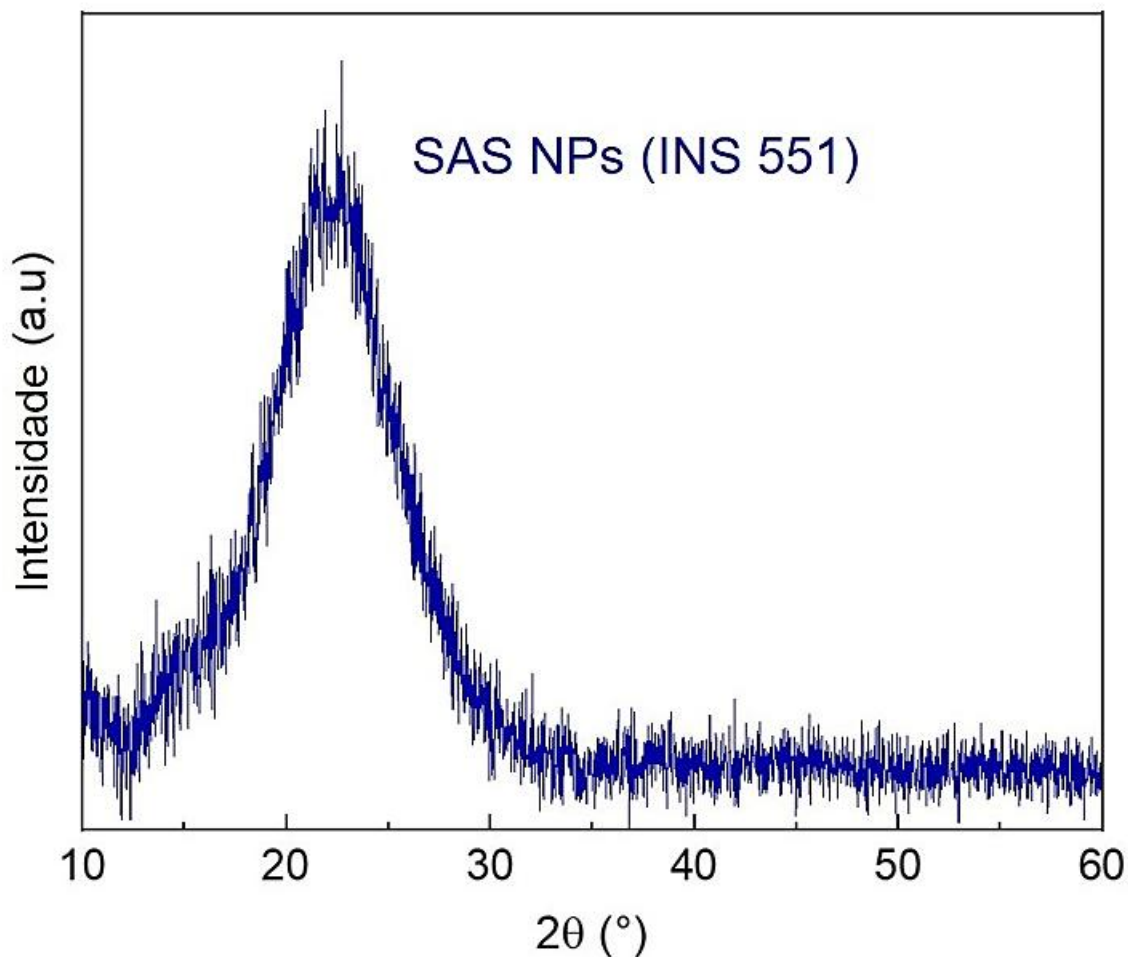


Figura 6. Análise da estrutura cristalina do INS 551: A estrutura cristalina foi avaliada por DRX. O difratograma apresenta o padrão amorfo.

5.3 Tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) do INS 551

A análise de DLS foi empregada para determinar o tamanho hidrodinâmico médio e o PDI das partículas de INS 551 em diferentes condições de dispersão. Considerando que na indústria não há um protocolo padronizado quanto ao estado de dispersão dessas partículas em meios biológicos, as análises foram realizadas tanto em suspensão direta quanto após aplicação de protocolos controlados de dispersão.

Na condição sem dispersão, as partículas apresentaram tamanhos hidrodinâmicos elevados e heterogêneos, indicando formação de grandes agregados. O INS 551 exibiu tamanho médio de $3882,67 \pm 1820,13$ nm em água, $4295,00 \pm 2587,35$ nm em DMEM Low Glucose e $4842,67 \pm 3661,31$ nm em DMEM High Glucose, com PDI elevados ($0,875 \pm 0,216$ a $0,987 \pm 0,022$). Quanto ao potencial zeta, o INS 551 apresentou menor estabilidade coloidal nos meios DMEM (Low e High) Glucose, ~ -9 mV, comparativamente à água, ~ -26 mV, sugerindo uma maior tendência à agregação nas condições de cultivo celular (Figura 7).

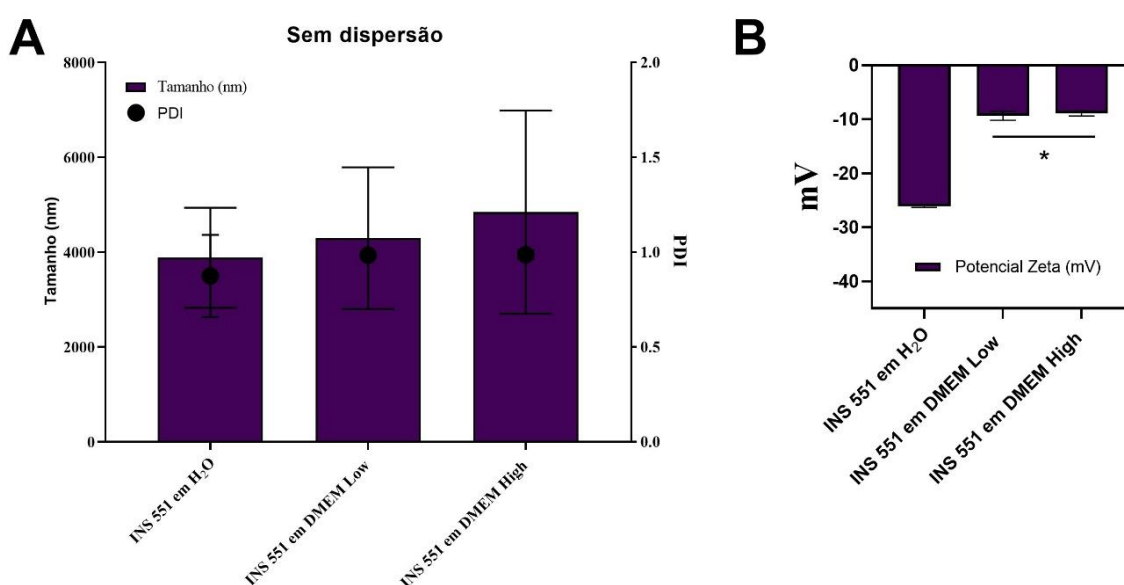


Figura 7. Tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ do INS 551 sem dispersão. A análise foi realizada por DLS em diferentes suspensões: água ultrapura (H₂O), DMEM Low Glucose e DMEM High Glucose. Os dados são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o INS 551 em água ($p < 0,05$), ANOVA com teste de Tukey.

Após a aplicação dos respectivos protocolos de dispersão (A e B), as partículas de INS 551 apresentaram uma melhora significativa, com uma redução no tamanho hidrodinâmico médio e maior homogeneidade, evidenciada pela diminuição dos valores de PDI.

As partículas submetidas ao protocolo de Dispersão A mostraram um tamanho médio menor em água ($238,3 \pm 40,8$ nm, $p < 0,05$) quando comparadas às diluídas em DMEM Low Glucose e DMEM High Glucose que apresentaram tamanhos de $292,9 \pm 50,1$ nm e $298,7 \pm 66,5$ nm, respectivamente (Figura 8A).

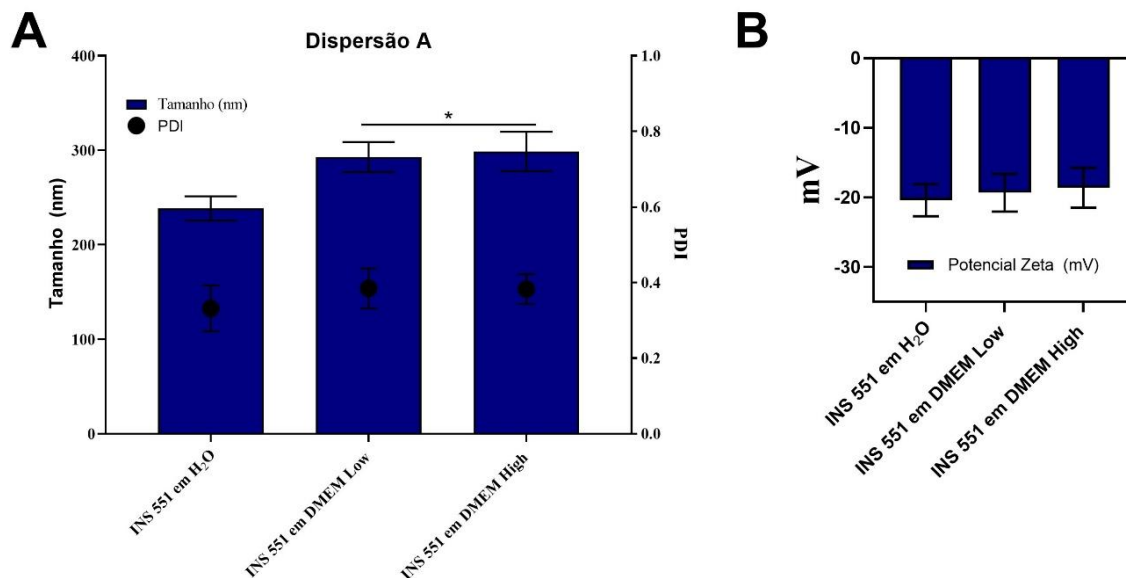


Figura 8. Tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ do INS 551 Dispersão A. A análise foi realizada por DLS em diferentes suspensões: água ultrapura (H₂O), DMEM Low Glucose e DMEM High Glucose. Os dados são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o INS 551 em água ($p < 0,05$), ANOVA com teste de Tukey.

Já o protocolo de Dispersão B resultou em partículas maiores, com tamanhos variando entre 1300 e 1600 nm (Figura 9A). Em ambos os casos, os valores de PDI se mantiveram abaixo de 1,0, indicando uma distribuição de tamanho moderadamente homogênea. As medições de PZ (Figuras 8B e 9B) revelaram que todas as amostras possuíam carga superficial negativa. As partículas do protocolo B, em particular, apresentaram um PZ significativamente mais negativo em água do que em DMEM ($p < 0,05$), sugerindo uma maior estabilidade coloidal quando dispersas em água.

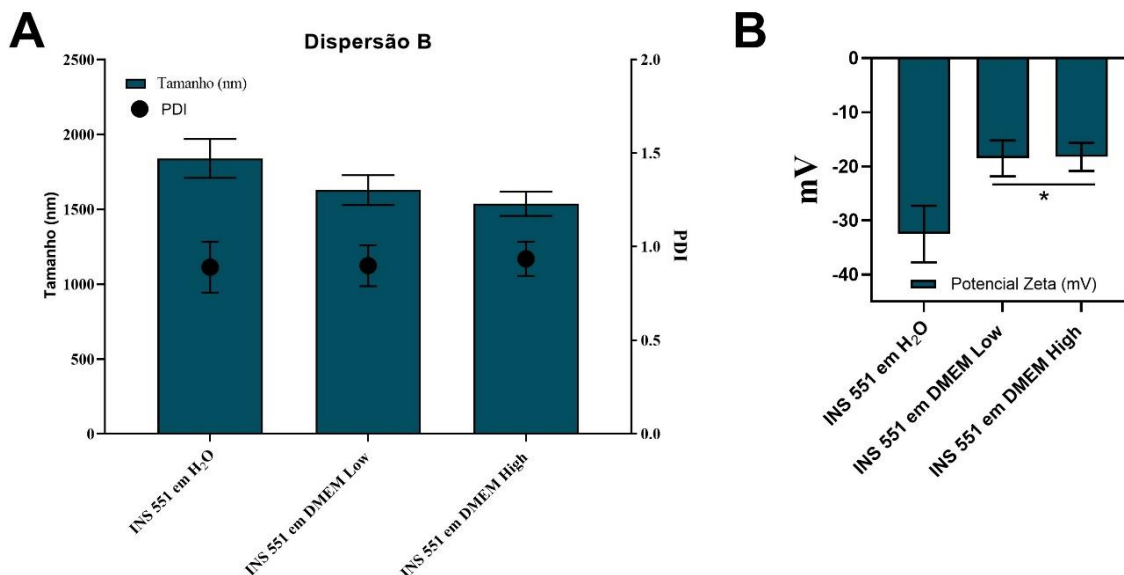


Figura 9. Tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ do INS 551 Dispersão B. A análise foi realizada por DLS em diferentes suspensões: água ultrapura (H₂O), DMEM Low Glucose e DMEM High Glucose. Os dados são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em comparação com o INS 551 em água ($p < 0,05$), ANOVA com teste de Tukey.

Apesar de os diâmetros hidrodinâmicos médios das partículas de INS 551, obtidos a partir de ambos os protocolos de dispersão, terem se mantido acima de 100 nm, a análise da distribuição por intensidade indicou que a Dispersão A apresentou uma população mais homogênea em comparação às demais amostras (Dispersão B e sem dispersão) (Figura 10).

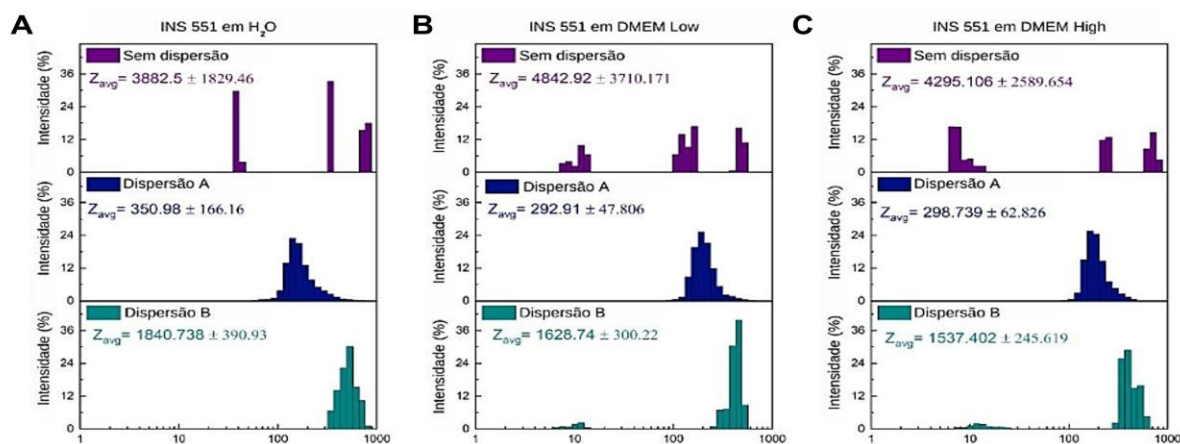


Figura 10. Distribuição percentual da intensidade em função do tamanho hidrodinâmico (d.nm) do INS 551 em diferentes meios: água ultrapura (A), DMEM Low Glucose (B) e DMEM High Glucose

(C). As análises foram realizadas nas condições: sem dispersão (roxo), após o protocolo de Dispersão A (agitação + sonicação, azul) e com o protocolo de Dispersão B (somente agitação, verde). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.

5.4 Morfologia do INS 551

As micrografias de MEV do INS 551 em água ultrapura, após o processo de secagem, estão apresentadas na Figura 11 (A–D). A análise morfológica evidenciou que as NPs de SAS apresentam formato irregular (amorfo), com ocorrência de agregados e aglomerados distribuídos ao longo das amostras. Observa-se uma distribuição heterogênea das partículas, caracterizada por regiões com maior dispersão e áreas com aglomeração mais densa. Ademais, as diferentes ampliações permitiram identificar partículas primárias de dimensões reduzidas, indicando que, mesmo diante dos aglomerados, o INS 551 preserva uma fração de nanopartículas individualizadas.

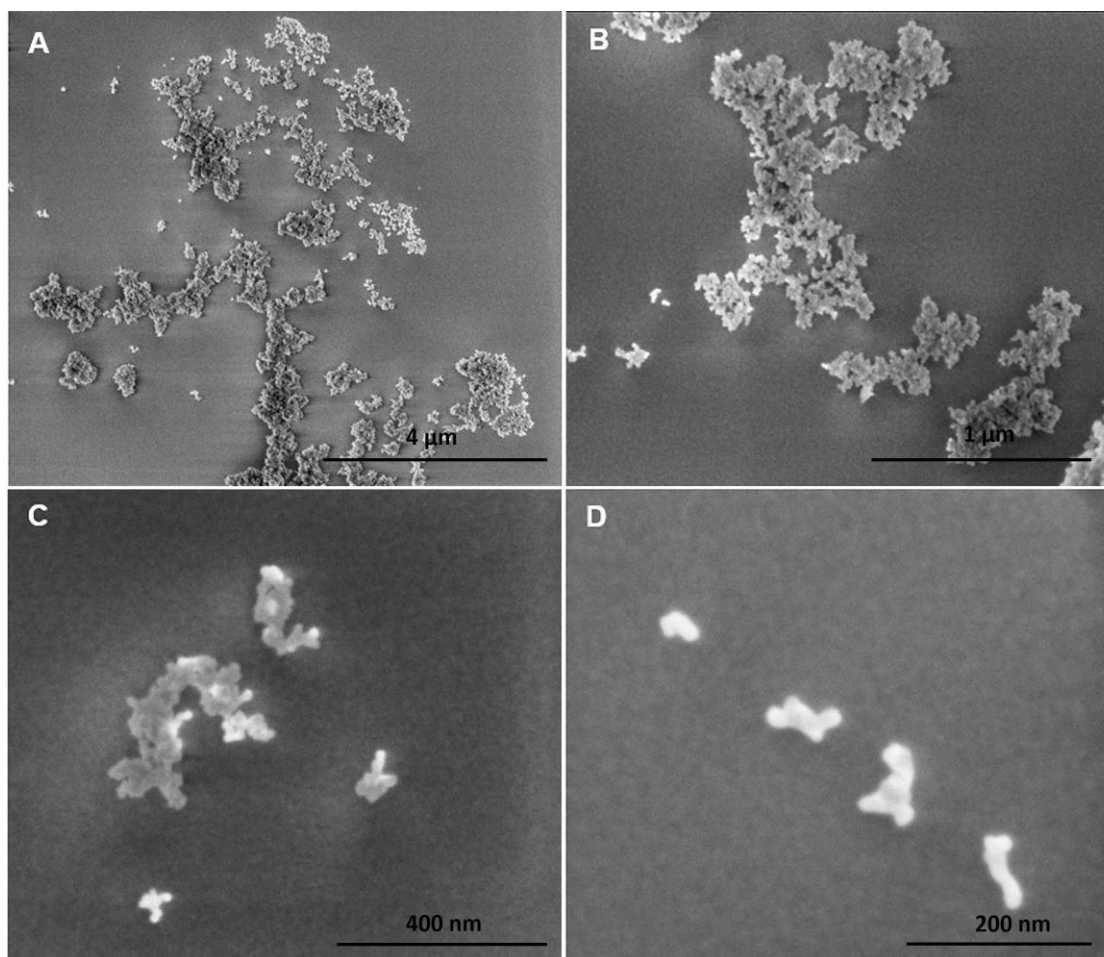


Figura 11. Morfologia do INS 551 por MEV. Essa análise foi realizada em diferentes aumentos, sendo eles: A- 4 μm ; B- 1 μm ; C- 400 nm D- 200 nm.

A morfologia superficial das partículas também foi analisada, demonstrando uma textura irregular (Figura 12 A) e porosa (Figura 12 B), característica comum das NPs de SAS.

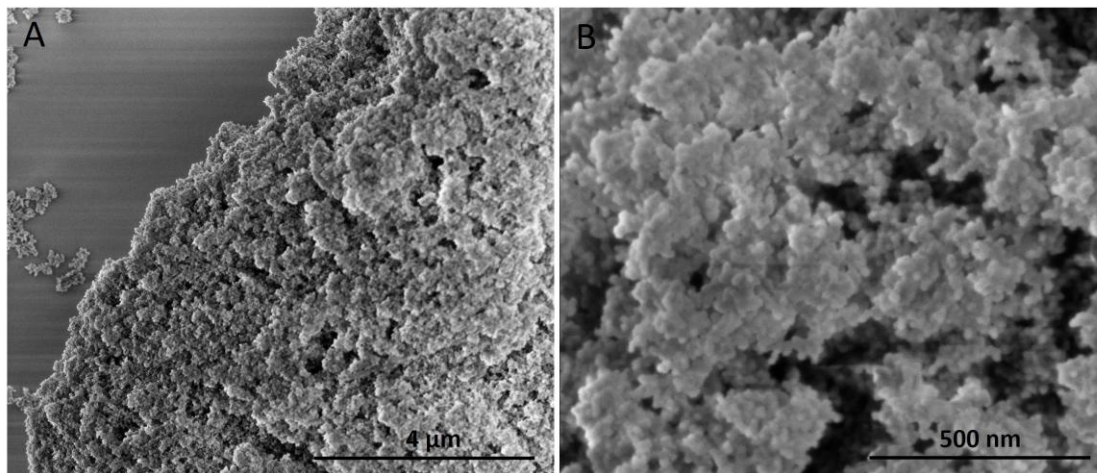


Figura 12. Micrografias de MEV das partículas de INS 551 mostrando superfície irregular e porosa: (A) visão geral dos aglomerados; (B) ampliação destacando a textura heterogênea e a presença de porosidade.

A análise complementar por MET permitiu uma avaliação mais detalhada do estado de aglomeração e do tamanho primário das partículas de INS 551. As micrografias de MET (Figuras 13A e 13B) evidenciam uma forte aglomeração das partículas de INS 551 tanto em água ultrapura (A) quanto em meio de cultura (B). As Figuras 13C e 13D mostram o INS 551 em água após a dispersão, sendo a Figura 13C referente à Dispersão A e a Figura 13D à Dispersão B, ambas apresentando partículas na escala nanométrica.

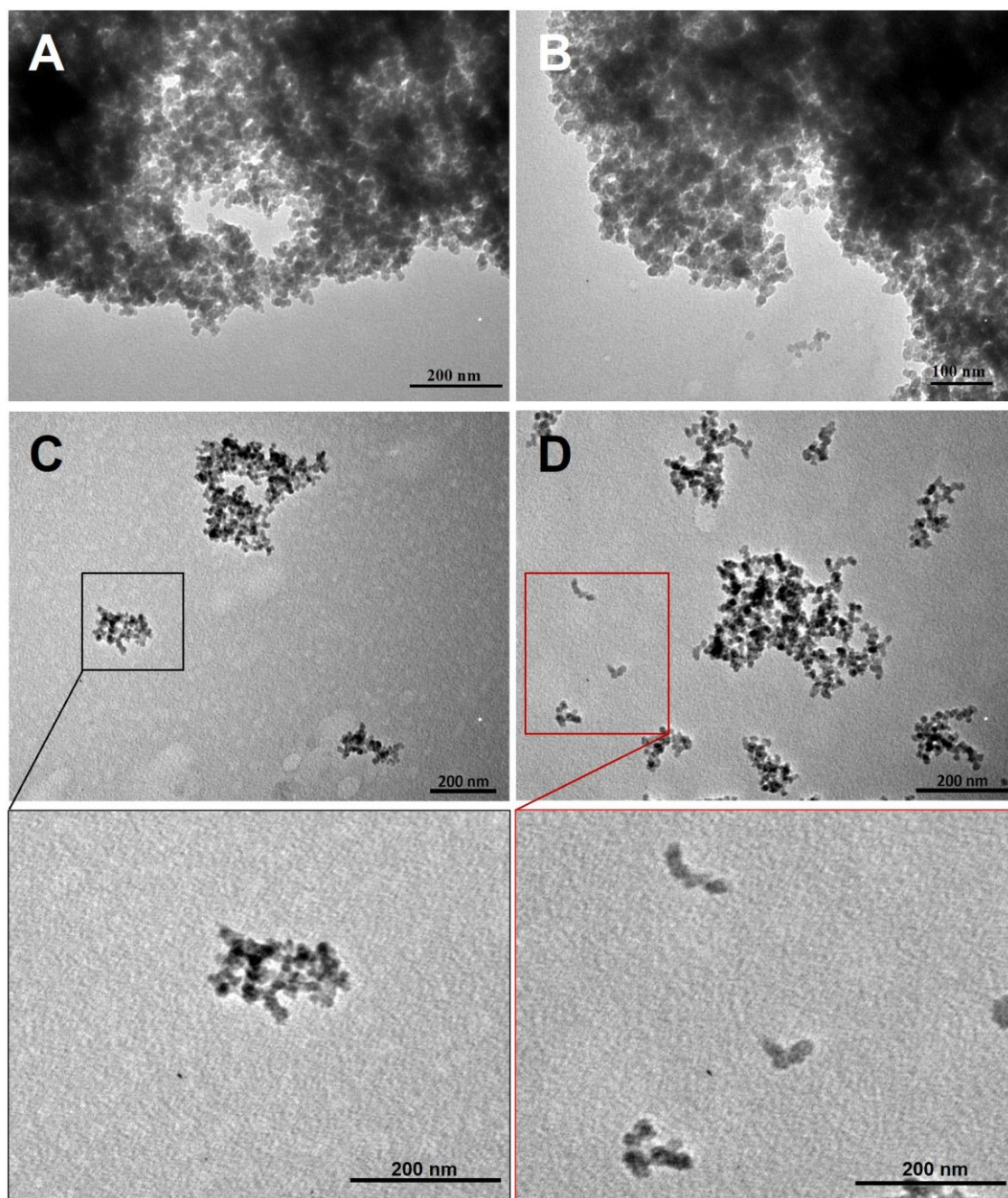


Figura 13. Micrografias de MET de INS 551. MET do INS 551 a 1 mg/mL sem dispersão em água ultrapura (barras de escala de 200 nm) (A) e em meio de cultura (barras de escala de 200 nm) (B), e após diferentes métodos de dispersão: Dispersão A (barras de escala de 200 nm) (C) e Dispersão B (barras de escala de 200 nm) (D).

Nas Figuras 14, é possível observar o INS 551 nos meios DMEM Low Glucose e DMEM High Glucose após a dispersão, sendo as Figuras 14A e 14C referentes à

Dispersão A, e as Figuras 14B e 14D referentes à Dispersão B, com ambas apresentando partículas na escala nanométrica.

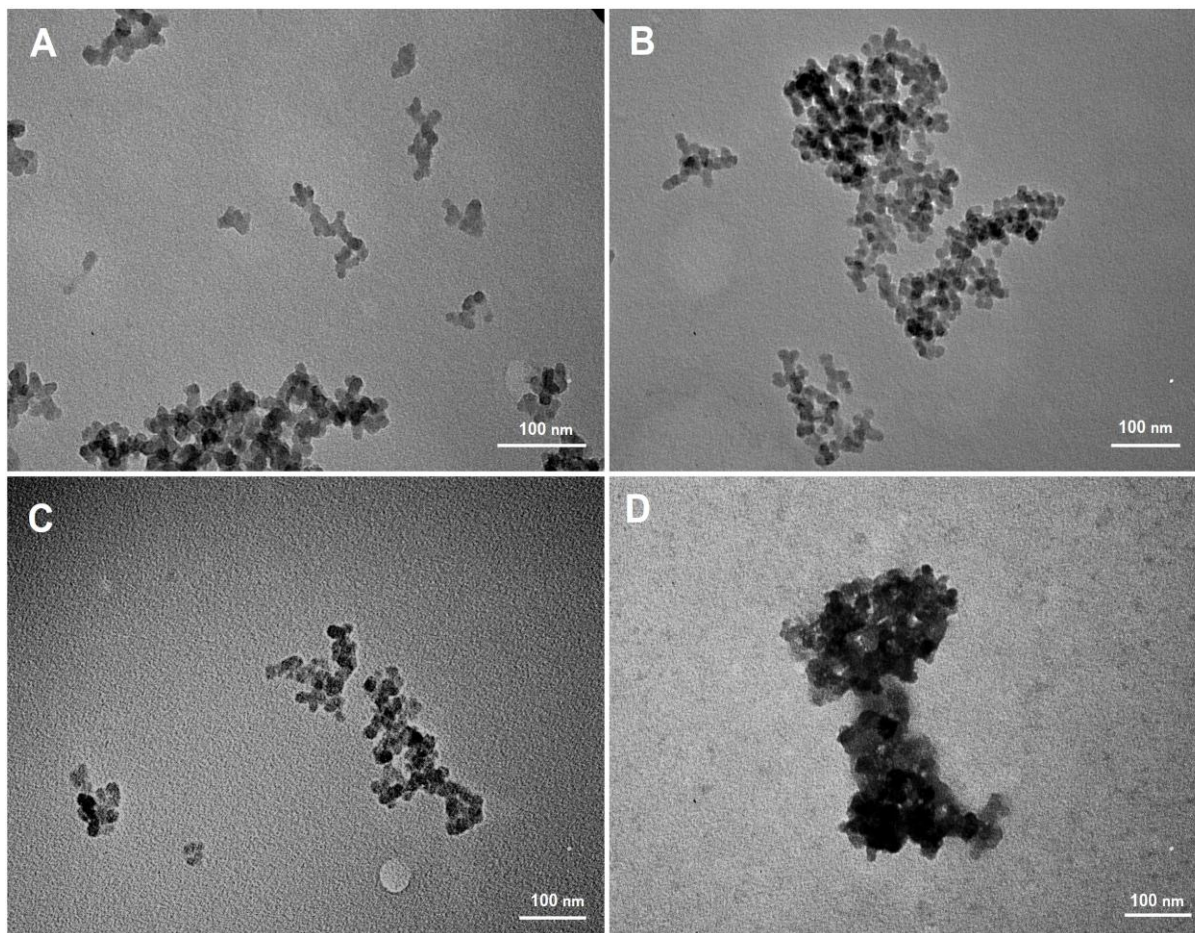


Figura 14. Análise do INS 551 por MET em DMEM Low Glucose (A e B) e DMEM High Glucose (C e D). Observa-se uma redução na presença de agregados e aglomerados, bem como a presença de partículas em nanoescala nas amostras submetidas à Dispersão A (A e C), em comparação com as amostras da Dispersão B (B e D).

5.5 Avaliação de adsorção proteica do INS 551

A análise de adsorção proteica por SDS-PAGE foi conduzida após a exposição do INS 551 ao meio de cultura suplementado com SFB. Observou-se que a maior concentração de NPs de SAS (500 $\mu\text{g/mL}$) resultou em bandas proteicas mais intensas, indicando um aumento na adsorção proteica. Além disso, as concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um perfil proteico mais complexo, com a presença de bandas adicionais em comparação à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 15). Esse comportamento era esperado, uma vez que

concentrações mais elevadas de INS 551 proporcionam uma maior superfície disponível para adsorção de proteínas.

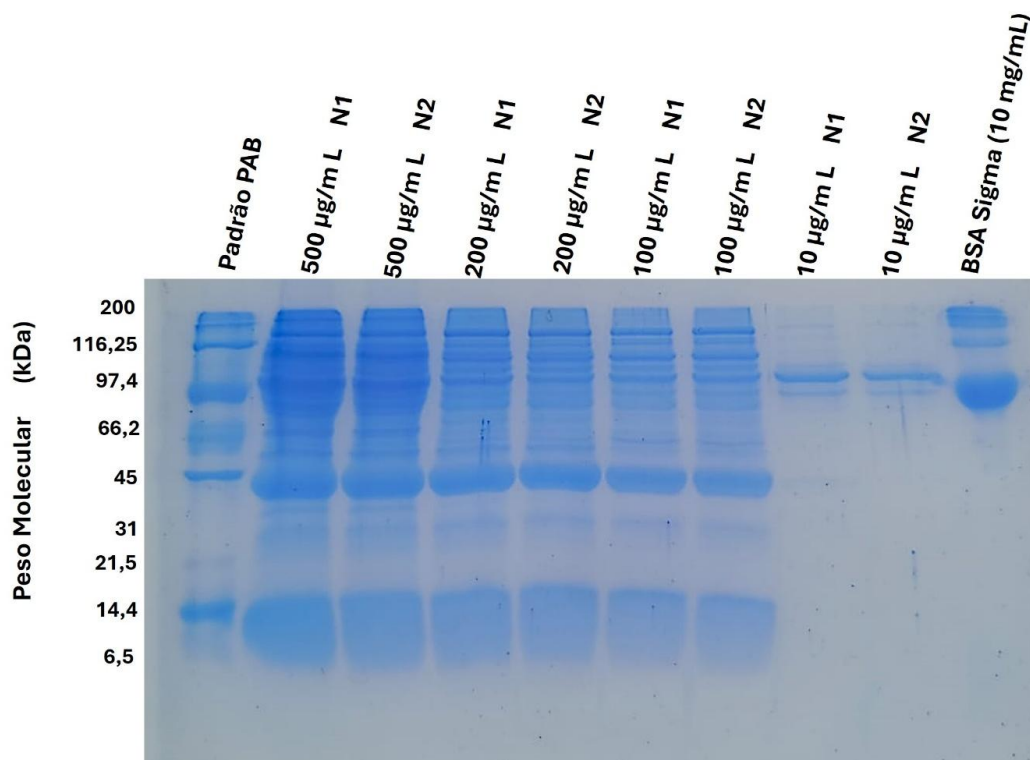


Figura 15. SDS-PAGE evidenciando a adsorção de proteínas no INS 551. Nas concentrações de 500 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL é possível observar um perfil proteico mais evidente do que a concentração de 10 µg/mL.

O Quadro 1 abaixo representa o padrão molecular dado pelo fabricante BioRad, que fornece um padrão de peso molecular em daltons (kDa).

Peso molecular (kDa)	Proteína
200	Miosina
116,250	B-galactosidase
97,400	Fosforilase B
66,200	Albumina sérica
45	Ovoalbumina
31	Anidrase carbônica
21,5	Inibidor de tripsina
14,4	Lisozima
6,5	Aprotinina

Quadro 1: Especificações de proteína e peso molecular. O fabricante BioRad, fornece um padrão de peso molecular em Daltons (kDa), apresentando um padrão do gel correspondente para várias proteínas.

Será realizada a identificação e quantificação das proteínas adsorvidas na superfície dessas amostras. Para que isso fosse possível, as amostras passaram pela metodologia de preparo para a espectrometria de massas.

5.6 Análise de Absorbância por UV-Visível do INS 551

A avaliação da absorbância do INS 551 por espectrofotometria UV-Visível é um passo essencial para garantir que a coloração da amostra não interfira nos ensaios colorimétricos planejados, em especial no ensaio de MTT, cuja leitura ocorre em 570 nm. Caso o INS 551 apresente absorbância significativa nessa região do espectro, os resultados dos ensaios poderiam ser comprometidos devido a interferências ópticas, levando a interpretações equivocadas sobre a viabilidade celular.

Os resultados (Figura 16) indicaram que o INS 551 apresenta uma absorbância mínima na região de 570 nm, demonstrando que sua coloração não interfere significativamente nos ensaios de MTT. Podemos observar que o pico plasmônico do INS 551 é abaixo de 200 nm.

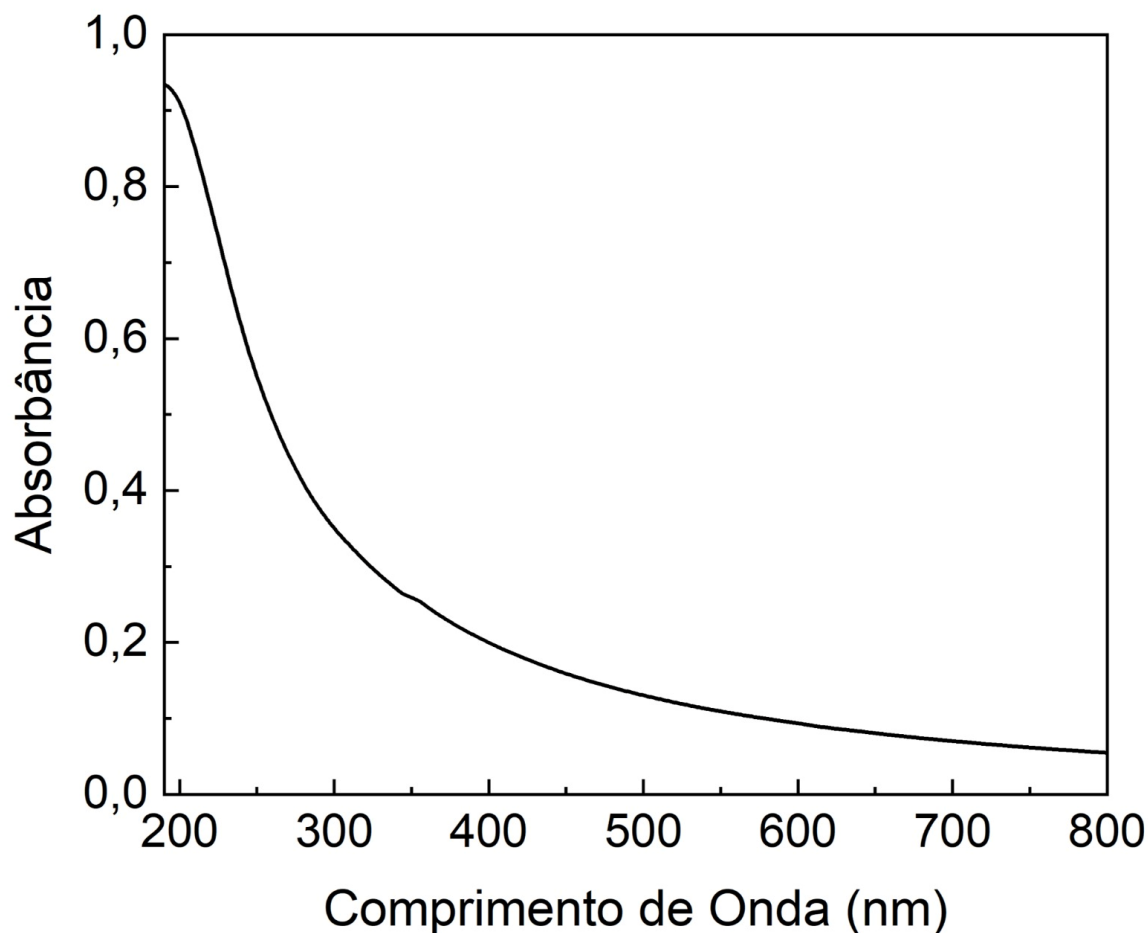


Figura 16. Avaliação da absorbância do INS 551 por UV-Visível. Não foi possível observar a formação de uma plasmônica. Esse resultado já era esperado, uma vez que, a sílica possui uma leitura abaixo de 200 nm. A partir desse resultado, conclui-se que a coloração do INS 551 não interfere nos ensaios colorimétricos.

5.7 Ensaios biológicos com o INS 551

5.7.1 Integridade de pipetagem

Inicialmente, nosso objetivo foi verificar se imprecisões na pipetagem, decorrentes de estimativas incorretas dos volumes de suspensão pipetados, poderiam afetar a confiabilidade do DP. Para isso, antes dos ensaios biológicos, realizamos o teste de integridade da pipetagem. Calculamos o fator de diluição pré-avaliado (fd_{ij} pré-avaliado) para as células Caco-2 (Figura 17A) e FGH (Figura 17B), assumindo densidades semelhantes entre a amostra a ser diluída e o meio de diluição. Em ambas as linhas celulares, obtivemos valores de R^2 próximos de 1,

conforme esperado, indicando um ótimo desempenho da pipetagem. Além disso, os valores de $\beta_{\text{pipetagem}}$ confirmaram a precisão e reprodutibilidade do processo em ambas as células.

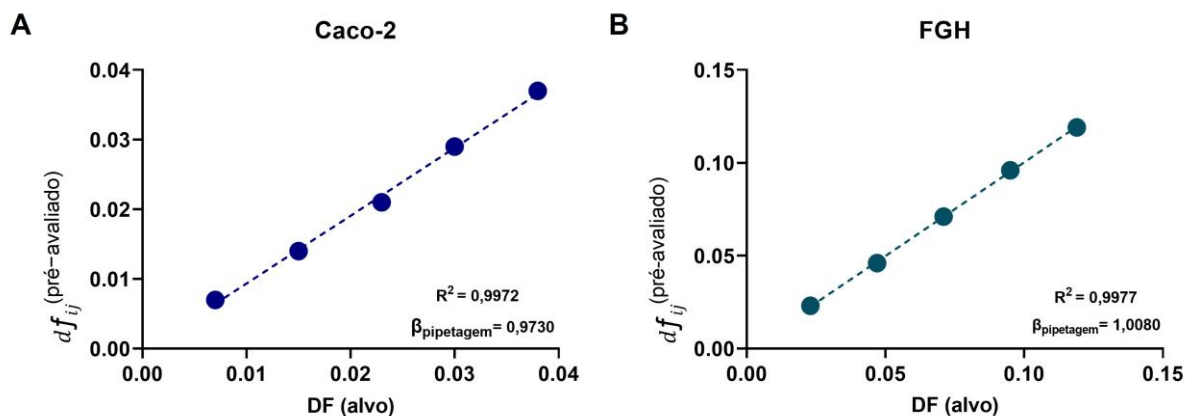


Figura 17. Avaliação da integridade e precisão da pipetagem nas linhas celulares Caco-2 (B) e FGH (A). Os coeficientes de determinação (R^2) foram 0,9972 para Caco-2 e 0,9977 para FGH. Os valores de $\beta_{\text{pipetagem}}$ foram 0,9730 para Caco-2 e 1,0080.

5.7.2 Tempo de duplicação celular

A determinação do tempo de duplicação celular é essencial para compreender a taxa de proliferação das linhagens estudadas. Para isso, a taxa de duplicação celular da FGH e da Caco-2 foi monitorada por 24 h, 48 h e 72 h após o tratamento com 19,82 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, e a curva de crescimento foi ajustada para o cálculo do tempo médio necessário para a duplicação da população celular.

Os resultados indicaram que as linhagens Caco-2 (Figura 18A) e FGH (Figura 18B) apresentaram um tempo de duplicação característico das células. Ambas as células não apresentaram diminuição no PDL após o tratamento com o INS 551.

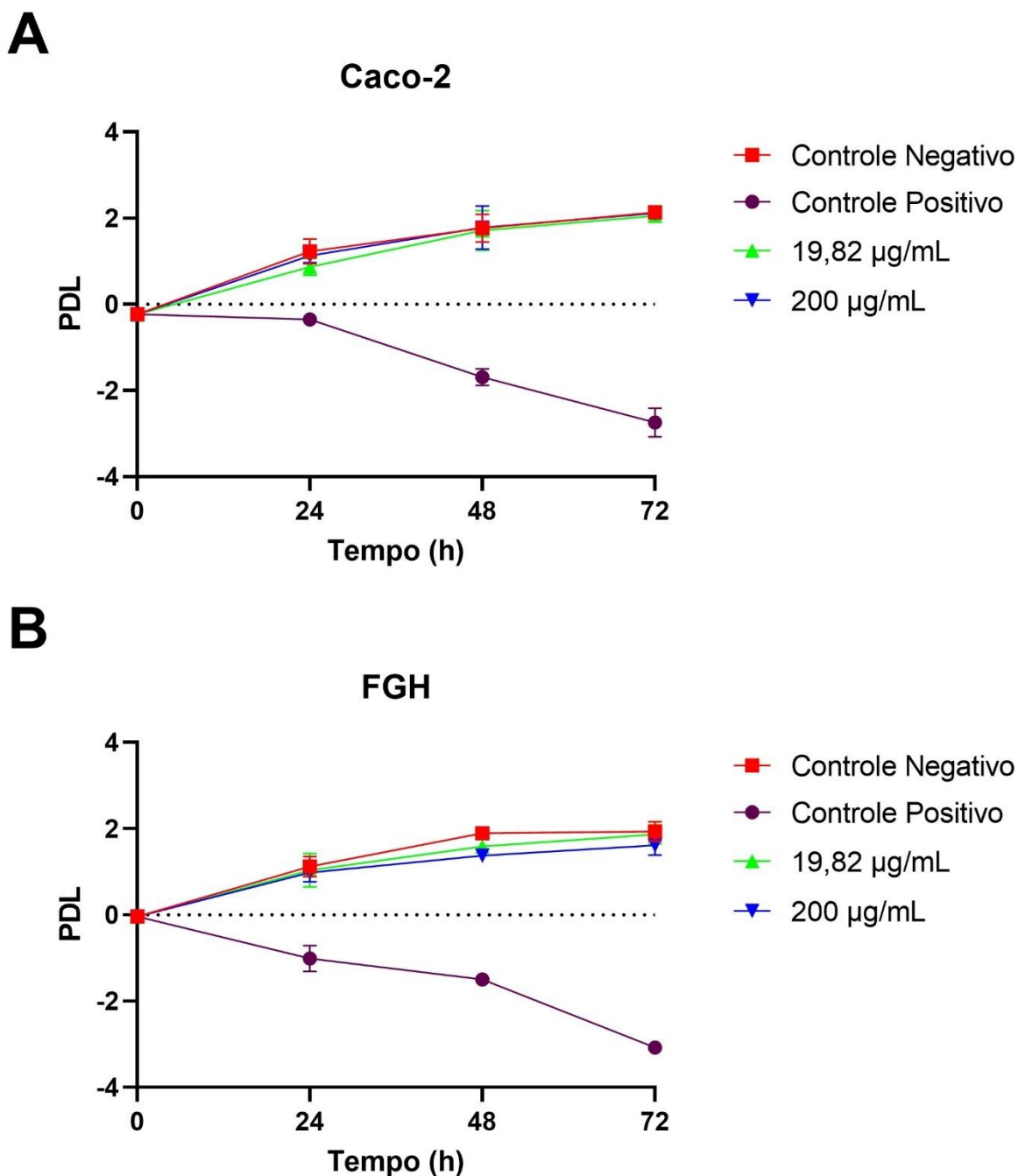


Figura 18. Tempo de duplicação celular após os tempos de 24 h, 48 h e 72 h de exposição ao **INS 551**. Em ambas a células, Caco-2 (A) e *FGH* (B), não houve diminuição do PDL após o tratamento. Indicando que essas partículas não apresentam impacto na proliferação celular.

5.7.3 Viabilidade das células após interação com o INS 551

O ensaio de MTT foi realizado para avaliar os efeitos da exposição ao INS 551 na viabilidade celular das linhagens Caco-2, FGH e fibroblastos L929 (conforme

recomendado na norma ISO 10993-5:2009), utilizando dois diferentes protocolos de dispersão (Dispersão A e B).

As células Caco-2 (Figura 19) foram expostas ao INS 551 por 72 h, em concentrações entre 19,82 e 200 µg/mL, utilizando os dois protocolos de dispersão (A e B). Observou-se que a viabilidade celular permaneceu acima de 75% em todas as condições testadas, não havendo indícios de toxicidade significativa em comparação ao controle negativo. O controle positivo (DMSO) reduziu a viabilidade, confirmando a sensibilidade do ensaio e a confiabilidade dos resultados.

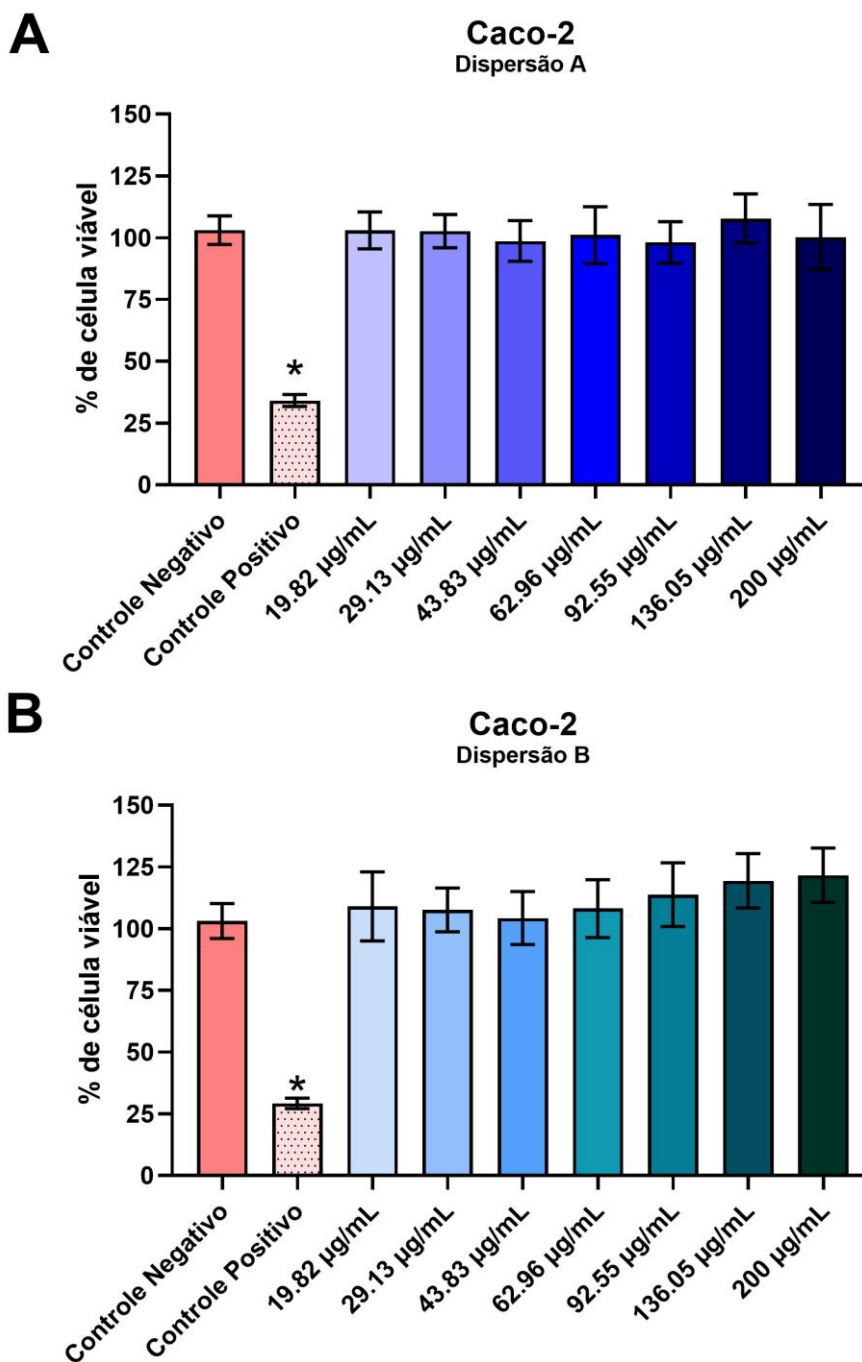


Figura 19. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição ao INS 551 na linhagem Caco-2. As células foram expostas ao INS 551 preparado pelos protocolos de dispersão A (A) e dispersão B (B) em sete diferentes concentrações (19,82; 29,13; 42,83; 62,96; 92,55; 136,05 e 200 µg/mL). Os resultados foram comparados com o controle negativo (células não tratadas) e o controle positivo (2,5% (v/v) de DMSO). Os dados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), segundo ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

A linhagem FGH (Figura 20), também exposta ao INS 551 por 72 horas, apresentou comportamento semelhante ao das células Caco-2, mantendo viabilidade superior a 75% em todas as concentrações analisadas.

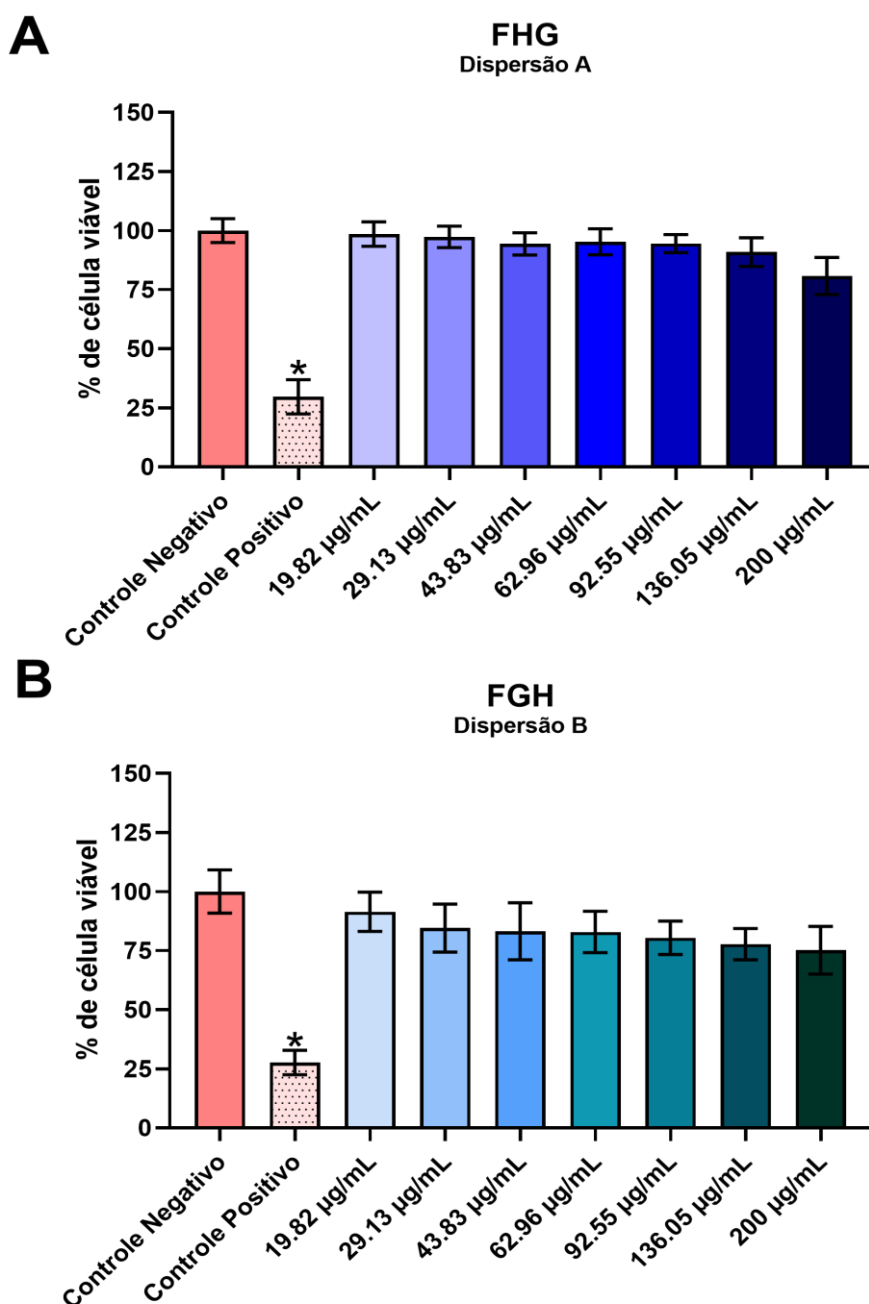


Figura 20. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição ao INS 551 na linhagem FGH. As células foram expostas ao INS 551 preparado pelos protocolos de dispersão A (A) e dispersão B (B) em sete diferentes concentrações (19,82; 29,13; 42,83; 62,96; 92,55; 136,05 e 200 µg/mL). Os resultados foram comparados com o controle negativo (células não tratadas) e o controle positivo (2,5% (v/v) de DMSO). Os dados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), segundo ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

No caso das células L929 (Figura 21), a exposição ao INS 551 ocorreu por 24 h, conforme estabelecido pela ISO 10993-5:2009. Assim como nas demais linhagens, não foram observados efeitos tóxicos relevantes, com viabilidade celular sempre superior a 75% mesmo na maior concentração testada.

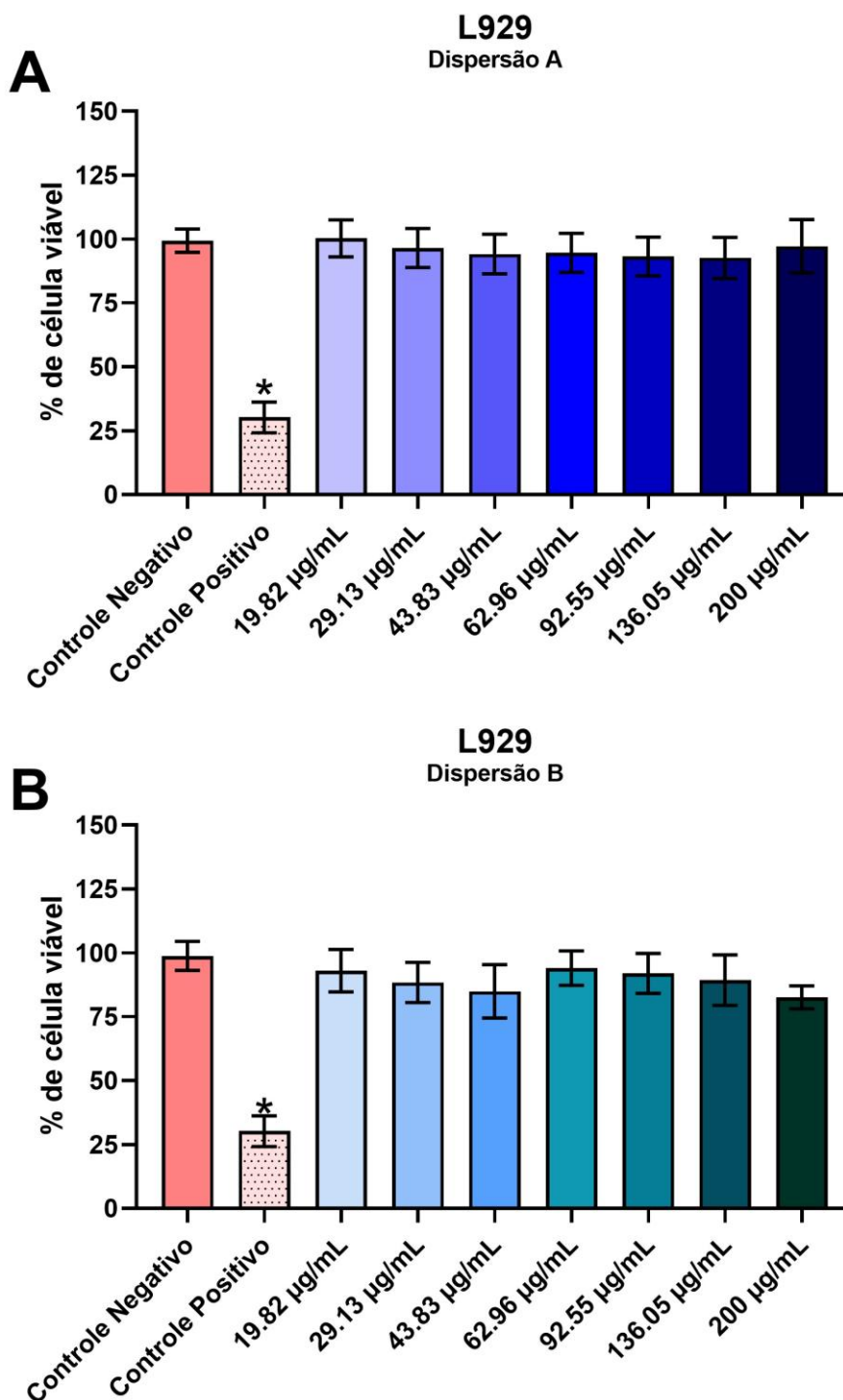


Figura 21. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após exposição ao INS 551 na linhagem L929. As células foram expostas ao INS 551 preparado pelos protocolos de dispersão A (A) e dispersão B (B) em sete diferentes concentrações (19,82; 29,13; 42,83; 62,96; 92,55; 136,05 e 200

$\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram comparados com o controle negativo (células não tratadas) e o controle positivo (7,5% (v/v) de DMSO). Os dados são apresentados como média \pm DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), segundo ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

5.7.4 Índice celular após interação com o INS 551

Realizamos uma análise de proliferação celular utilizando a plataforma xCELLigence nas linhagens Caco-2 (Figura 22A e 23A) e FGH (Figura 22B e 23B), expostas ao INS 551 ao longo de 72 h (o experimento inteiro foi de 96 h). Essa abordagem permite monitorar o comportamento celular em tempo real (adesão, proliferação e IC) sem a necessidade de reagentes colorimétricos.

No presente estudo, após 24 h do plaqueamento, as linhagens FGH e Caco-2 foram expostas ao INS 551 em diferentes concentrações (19,82; 29,13; 42,83; 62,96; 92,55; 136,05; e 200 $\mu\text{g/mL}$). Os controles utilizados foram: Controle de Meio (meio suplementado com SFB), controle de veículo (concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ após a dispersão), controle negativo (células sem exposição) e controle positivo (células expostas a 20% de DMSO).

Em ambas as linhagens celulares, a fase inicial das curvas de crescimento (24 h) refletiu o processo de adesão, seguido por uma fase característica de crescimento exponencial.

Após 72 h de exposição, tanto Caco-2 quanto FGH mantiveram crescimento estável, uma vez que o INS 551 não ocasionou alterações significativas no IC em comparação ao controle negativo, indicando ausência de citotoxicidade. O controle positivo, tratado com 20% de DMSO, apresentou redução acentuada do IC, confirmando a sensibilidade do ensaio.

Ao longo de todo o experimento, observou-se que a linhagem FGH exibiu valores de IC consistentemente menores em relação à linhagem Caco-2, o que está de acordo com a dinâmica intrínseca de crescimento desse tipo celular.

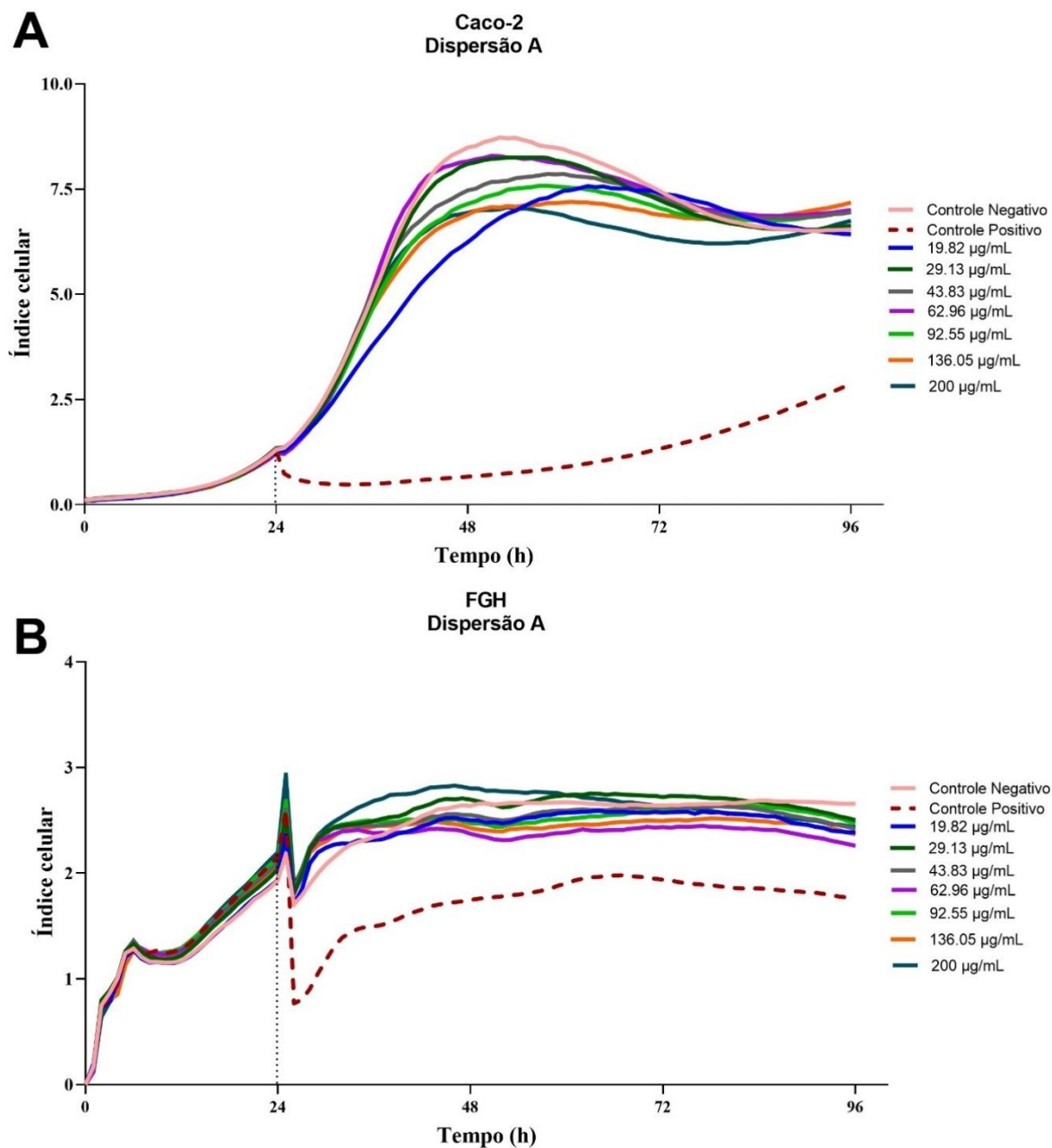


Figura 22. Ensaio de impedância elétrica das células Caco-2 (A) e FGH (B) após a exposição de INS 551. Observou-se que, em todas as concentrações testadas, as curvas de crescimento celular mantiveram-se estáveis. O controle negativo correspondeu a células não tratadas, enquanto o controle positivo consistiu na exposição a 20% v/v de DMSO.

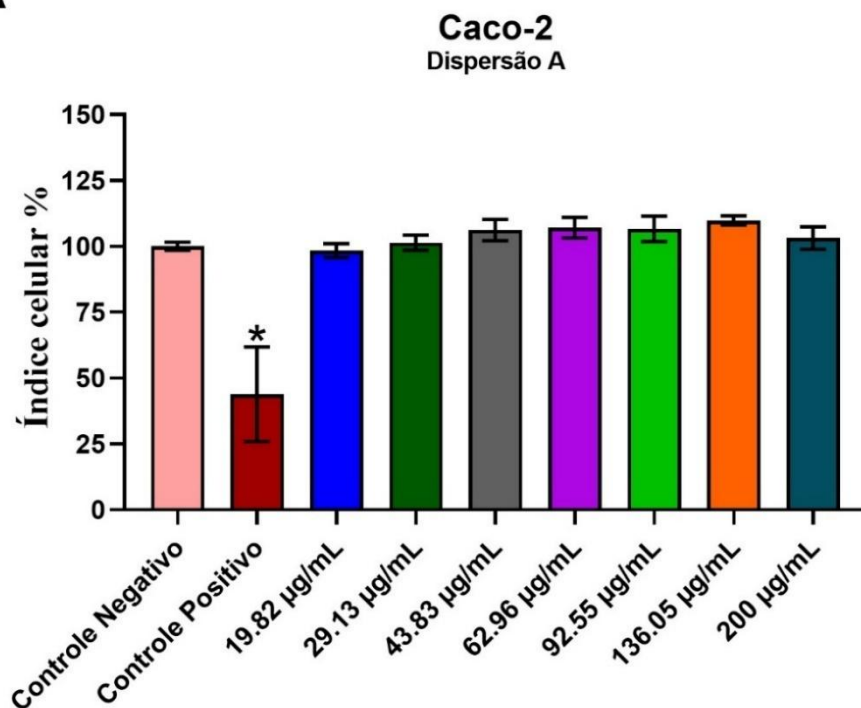
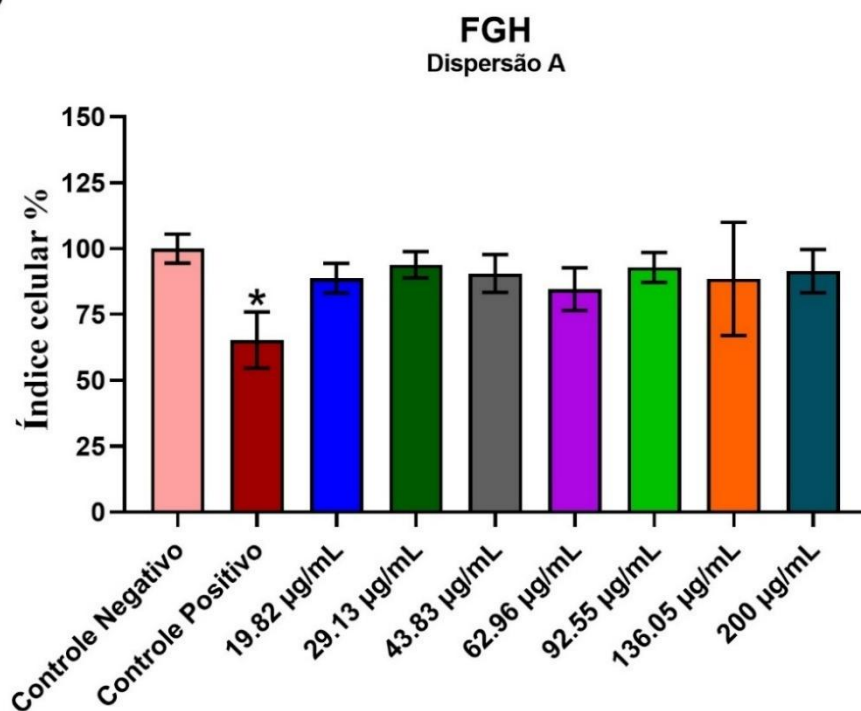
A**B**

Figura 23. Porcentagem do IC das células Caco-2 (A) e FGH (B) normalizada em relação ao controle negativo, após 72 h de tratamento com INS 551. Os resultados representam a média \pm intervalo de confiança de 95%. *Indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), ANOVA com teste de Tukey.

5.7.5 Análise de alterações morfológicas e internalização do INS 551

Após 72 h de exposição a 200 $\mu\text{g/mL}$ foi observada a internalização de NPs de INS 551 em ambos os tipos celulares (Caco-2 e FGH). Observa-se a presença de INS 551 dentro das células Caco-2 (Figura 24A) e FGH (Figura 24B), localizando-se predominantemente no citoplasma, inseridas em vesículas membranosas.

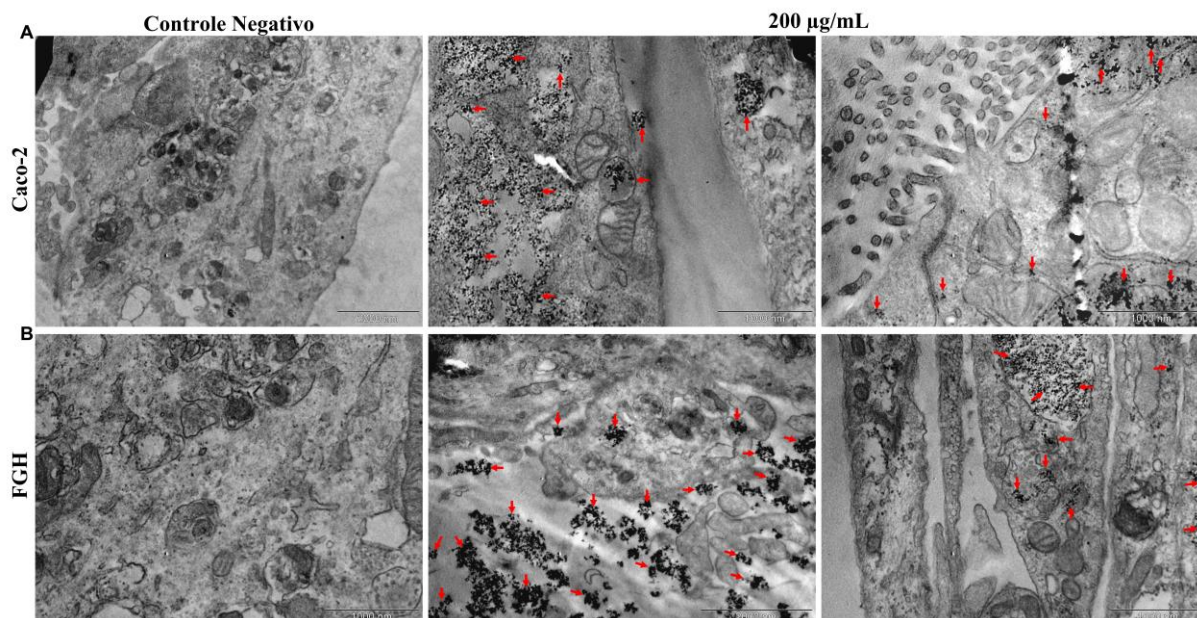


Figura 24. Análise da internalização das NPs de INS 551 por MET após 72 h de exposição à concentração máxima de 200 $\mu\text{g/mL}$. Foram identificadas estruturas com alta densidade eletrônica, compatíveis com as NPs de INS 551 internalizadas (indicadas por setas). Nas amostras controle, observou-se manutenção da morfologia celular e ausência dessas estruturas eletrondensas. As barras de escala correspondem a Caco-2 (2000 nm, 1000 nm, 1000 nm) (A) e FGH (1000 nm, 2000 nm, 1000 nm) (B).

As alterações morfológicas após 72 h de tratamento com INS 551 foram avaliadas por MEV. Na amostra controle das células Caco-2, observou-se uma ultraestrutura apical característica, com microvilosidades curtas e bem organizadas. Já nas células FGH controle, a superfície exibiu uma aparência lisa, com morfologia fibrilar preservada. As micrografias revelaram mudanças ultraestruturais evidentes em ambas as linhas celulares tratadas com 19,82 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, em comparação aos respectivos controles.

Nas Caco-2 (Figura 25), a menor concentração (19,82 $\mu\text{g/mL}$) promoveu um aumento na densidade e alongamento marcante das microvilosidades. Por outro lado, a concentração maior (200 $\mu\text{g/mL}$) causou uma perturbação severa da superfície apical, caracterizada pela completa desorganização dos microvilos e pela presença de material particulado amorfo aderido, compatível com as NPs de INS 551.

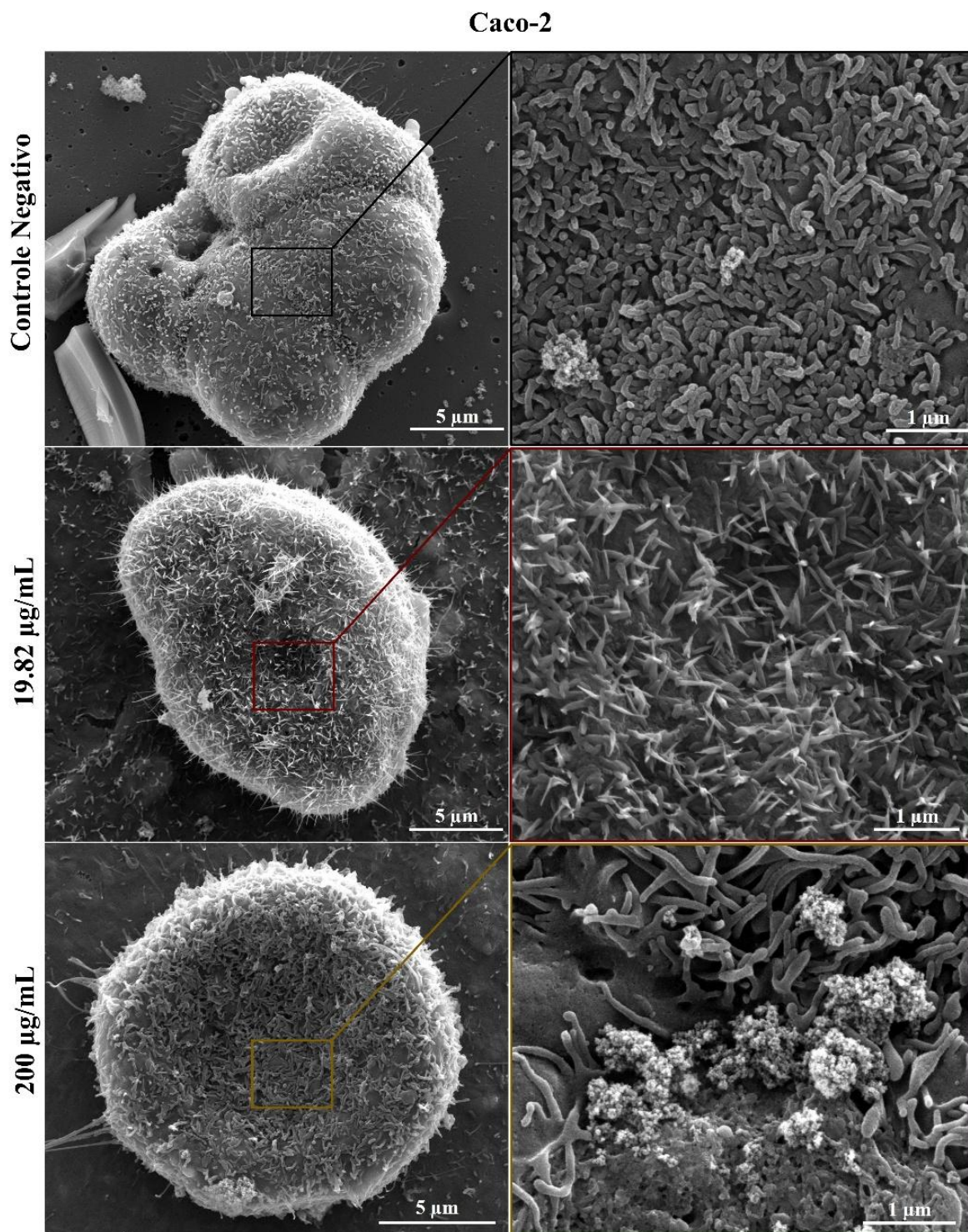


Figura 25. Micrografias por MEV das células Caco-2 após 72 h de exposição NPs de INS 551. É possível observar alterações morfológicas relacionado à exposição as NP INS 551.

No caso das células FGH (Figura 26), a exposição a 19,82 µg/mL resultou na formação de vesículas de membrana e em um discreto aumento da rugosidade da superfície, sem comprometer a estrutura geral. Entretanto, com 200 µg/mL, foi

observado um acúmulo significativo de material particulado na superfície celular, formando grandes aglomerados, o que sugere uma possível interação com a matriz extracelular.

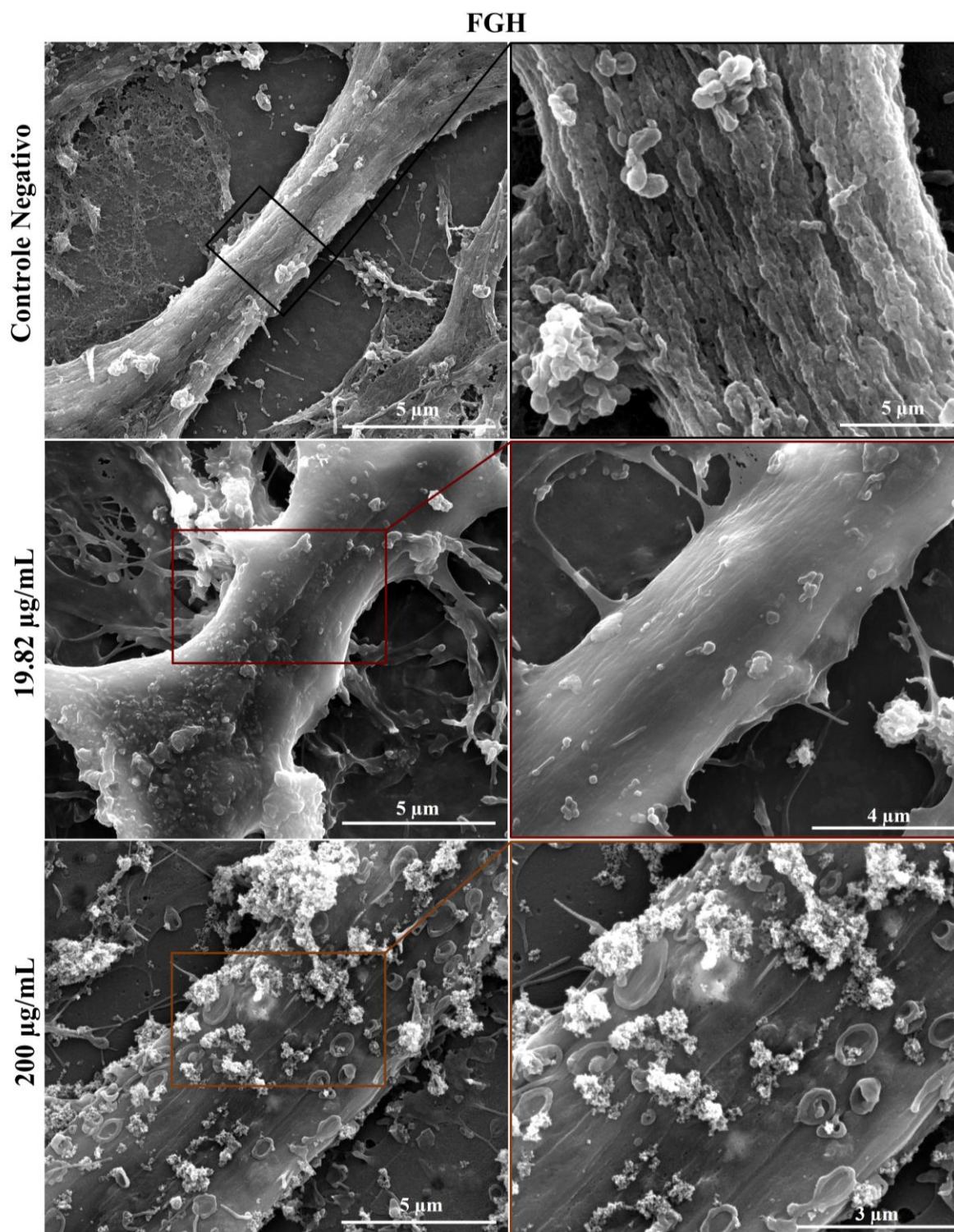


Figura 26. Micrografias por MEV das células FGH após 72 h de exposição a NPs de INS 551. É possível observar alterações morfológicas relacionadas à exposição às NP INS 551.

5.7.6 Ensaio de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) após interação com INS 551

Para investigar o potencial efeito oxidativo do INS 551, avaliamos a produção de ROS nas linhagens Caco-2 e FGH após 72 h de exposição às concentrações de 19,81 µg/mL e 200 µg/mL. A produção de ROS foi avaliada por ensaio fluorimétrico sensível à atividade oxidativa celular.

As linhagens Caco-2 (Figura 27A) e FGH (Figura 27B) não apresentaram aumento significativo na produção de ROS em comparação ao controle negativo, indicando ausência de estresse oxidativo mensurável nas condições testadas. Em contraste, o controle positivo (tratamento com DMSO) resultou em aumento estatisticamente significativo da produção de ROS ($p < 0,05$), confirmando a sensibilidade do ensaio.

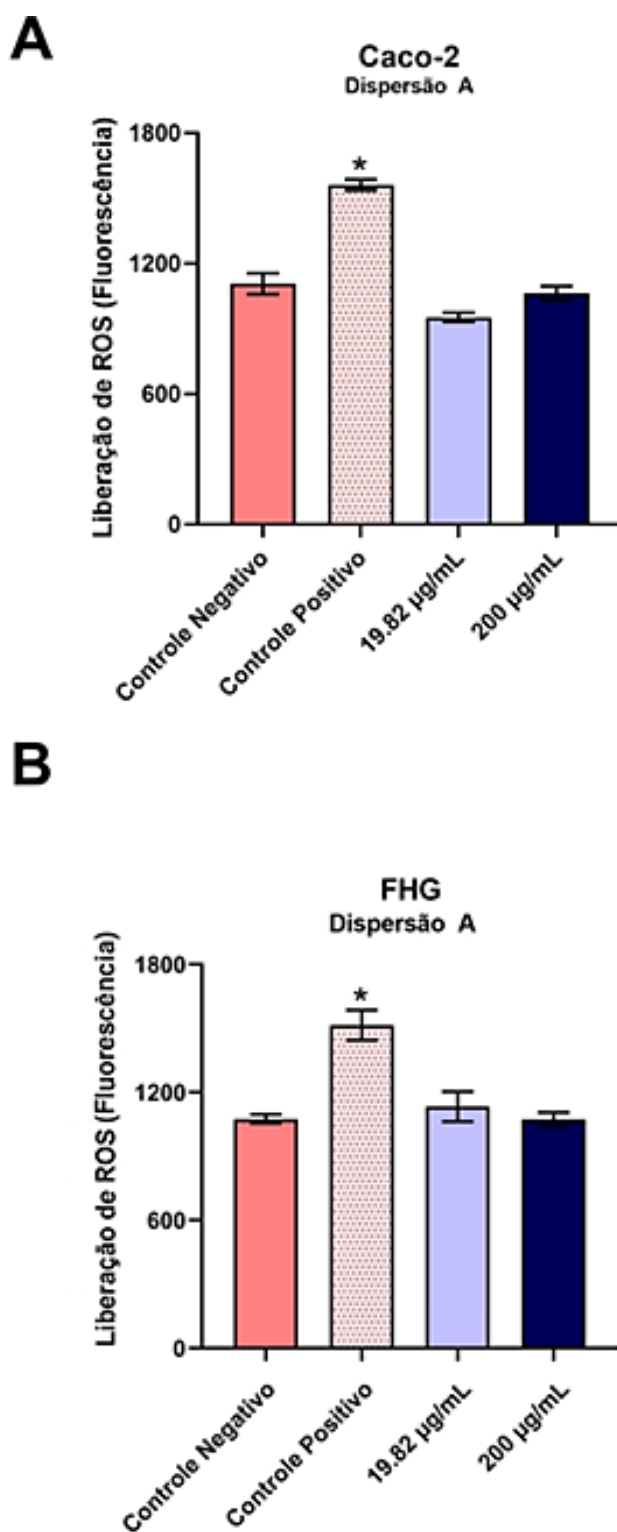


Figura 27. Ensaio de liberação de ROS após 72 h de exposição ao INS 551. Em A observa-se a linhagem Caco-2 e em B observa-se a linhagem FHG. Não foi observado aumento significativo na produção de ROS em ambas as linhagens celulares nas concentrações testadas. Os dados são expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), ANOVA com teste de Tukey.

5.7.7 Análise de mediadores inflamatórios após interação com o INS 551

Para investigar o impacto do INS 551 na resposta inflamatória celular, avaliamos a liberação de citocinas das linhagens FHG após exposição às concentrações de 19,82 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$. A análise foi realizada utilizando um painel multiplex, permitindo a detecção simultânea de diversos mediadores inflamatórios.

Os resultados indicaram que, entre as citocinas analisadas, apenas a eotaxina e o IP-10 apresentaram diferenças estatisticamente significativas na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Nessas condições, observou-se uma redução nos níveis dessas citocinas em comparação ao controle e à concentração de 19,82 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 28).

Os dados de mediadores inflamatórios com a Caco-2 ainda não foram realizados.

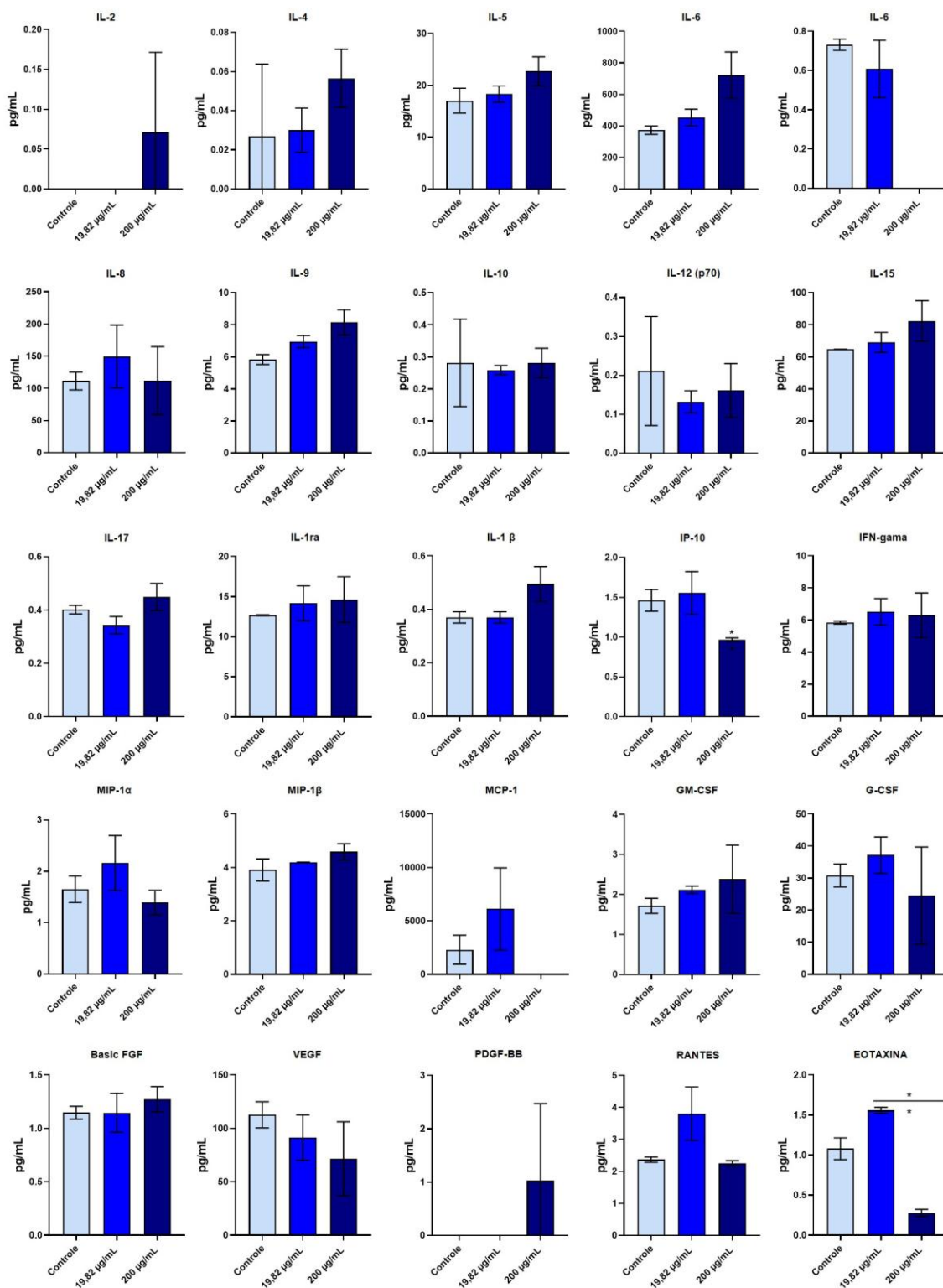


Figura 28. Avaliação da resposta inflamatória após exposição ao INS 551. A secreção de citocinas revelou uma redução significativa da eotaxina e do IP-10 na concentração de 200 µg/mL em comparação ao controle e à concentração de 19,81 µg/mL. A diminuição desses mediadores,

envolvidos no recrutamento de eosinófilos e na ativação da resposta imune, sugere um possível efeito imunomodulador do INS 551 em concentrações elevadas.

6. DISCUSSÃO

Os aditivos alimentares desempenham um papel crucial na indústria alimentícia, sendo amplamente utilizados para melhorar a estabilidade, textura e vida útil dos produtos (HUANG *et al.*, 2022). Nos últimos anos o uso de NMs nesses aditivos cresceu de forma significativa, essa incorporação trouxe avanços tecnológicos, em contrapartida, trouxe também a preocupação quanto à segurança alimentar e aos impactos na saúde humana (DEKKERS *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2020) Entre esses aditivos, destaca-se a SAS, utilizada principalmente como agente antiaglomerante em especiarias em pó, suplementos e misturas secas (ANVISA, 2023b; SHUKLA *et al.*, 2017), cuja composição pode conter até 70% de NPs (YOUNES *et al.*, 2018). No contexto regulatório, as SAS de grau alimentício recebem a denominação E551 na União Europeia e INS 551 no Brasil (ANVISA, 2023b; HEMPT *et al.*, 2020).

As agências reguladoras, como a ANVISA, FDA e EFSA, estabelecem normas para a utilização dos aditivos alimentares. No caso do INS 551, a ANVISA permite que até 2% dos produtos secos sejam compostos por esse aditivo. Já a EFSA, estabeleceu que o nível máximo desse aditivo é de 15.000 mg/Kg, ou seja, 1,5% da composição de aditivos alimentares (ANVISA, 2020; YOUNES *et al.*, 2018). O FDA por sua vez, não estabelece limites específicos de concentrações, uma vez que, considera esse aditivo como seguro (FDA, 2021).

Apesar de sua ampla aceitação regulatória, algumas lacunas relevantes no entendimento dos efeitos biológicos das NPs de SAS ainda persistem (KUMARI *et al.*, 2023). Ao realizar uma revisão da literatura, observa-se uma carência significativa de informações científicas específicas acerca do uso do aditivo INS 551 e de seus potenciais impactos no sistema digestório (PIECHULEK *et al.*, 2019). Embora diversos estudos tenham investigado a utilização das NPs de SAS, a maioria não esclarece se o material empregado corresponde efetivamente à sílica de grau alimentício, comprometendo, portanto, a interpretação dos dados e limitando a aplicabilidade dos resultados para a segurança alimentar (BRAND *et al.*, 2021).

A maioria dos estudos emprega NPs de SAS de grau industrial, como a NM-200 e a NM-203. Embora essas partículas sejam consideradas materiais de referência em pesquisas de nanossegurança (COMISSÃO EUROPEIA, 2013; OECD, 2016), elas

podem conter impurezas ou apresentar propriedades físico-químicas distintas como tamanho de partícula e grau de agregação quando comparados ao INS 551, o que influencia diretamente suas interações biológicas e potenciais efeitos tóxicos (MURUGADOSS *et al.*, 2017).

Por sua vez, o INS 551 é submetido a rigorosos processos de controle que asseguram sua segurança e compatibilidade com a ingestão humana (ANVISA, 2020; HEMPT *et al.*, 2021; YOUNES *et al.*, 2018) apresentando menores concentrações de impurezas metálicas e grupos silanois modificados em sua superfície, características que podem alterar significativamente sua reatividade biológica (BEHZADI *et al.*, 2017; FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016; MURUGADOSS *et al.*, 2017). Tanto as SAS de grau alimentício quanto as de grau industrial estão sujeitas a dinâmicas de agregação e desagregação, que variam conforme as condições ambientais, como as observadas no processo digestivo. Por esse motivo, torna-se essencial realizar caracterizações específicas para cada caso, a fim de garantir uma avaliação toxicológica mais precisa (BRAND *et al.*, 2021; MURUGADOSS *et al.*, 2017).

Essa limitação metodológica compromete a avaliação do impacto real desse aditivo, pois muitas vezes não há clareza sobre o tipo exato de sílica investigado e as condições experimentais utilizadas (HEMPT *et al.*, 2020). Além disso, a ausência de padronização entre os estudos de toxicidade gera uma variabilidade de resultados que dificulta a comparabilidade e a obtenção de um consenso científico sobre sua segurança (GRANJEIRO *et al.*, 2024).

Diante desse contexto, esta dissertação adotou uma abordagem criteriosa para a caracterização detalhada e avaliação dos efeitos do INS 551, utilizando modelos *in vitro* representativos do trato gastrointestinal. O objetivo principal foi investigar a segurança e biocompatibilidade dos aditivos alimentares à base de NPs de SAS (INS 551), por meio da exposição de células relevantes para o contato humano, abrangendo desde a primeira barreira da mucosa oral até os processos de absorção intestinal. Para isso, optou-se pelas linhagens celulares Caco-2 e FGH, cuja combinação possibilita uma avaliação ampla e integrada da resposta celular ao INS 551 (ANVISA, 2020; HEMPT *et al.*, 2021; YOUNES *et al.*, 2018).

A linhagem Caco-2, derivada de adenocarcinomas colorretais humanos, é amplamente reconhecida como o modelo padrão-ouro para estudos *in vitro* do epitélio intestinal (CAMPBELL *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2024). Quando diferenciadas, essas células desenvolvem características funcionais típicas dos enterócitos, incluindo a formação de microvilosidades, a expressão de transportadores específicos e a formação de junções oclusivas (*tight junctions*), que reproduzem fielmente a barreira intestinal. Dessa forma, o modelo Caco-2 possibilita a investigação detalhada da interação do INS 551 com a mucosa intestinal, bem como a avaliação de seus potenciais efeitos sobre a integridade da barreira epitelial e os processos de absorção (FLOOR *et al.*, 2025; IFTIKHAR *et al.*, 2020; LE *et al.*, 2023).

Já a linhagem FGH (Fibroblastos Gengivais Humanos), foi selecionada para representar a mucosa oral, que constitui a primeira barreira de contato para aditivos presentes em alimentos em pó (DIAS *et al.*, 2025; PIMENTEL *et al.*, 2022). Embora provenientes da gengiva, esses fibroblastos compartilham importantes características funcionais e estruturais com os fibroblastos do trato gastrointestinal, incluindo a capacidade de responder a estímulos inflamatórios e de participar na modulação do microambiente tecidual (CHALKIDI *et al.*, 2022; FADL *et al.*, 2023).

Dessa forma, a utilização combinada dessas duas linhagens possibilita uma avaliação abrangente dos efeitos do INS 551 no trato gastrointestinal, contemplando tanto os eventos iniciais da exposição oral quanto os processos subsequentes de absorção e interação com o epitélio intestinal, permitindo uma análise detalhada da biocompatibilidade e segurança deste aditivo alimentar.

A metodologia empregada neste trabalho combinou diferentes técnicas analíticas para possibilitar uma caracterização físico-química abrangente do material, juntamente com ensaios *in vitro* voltados à avaliação de viabilidade celular, IC, produção de ROS e resposta inflamatória.

Para a caracterização, foram utilizadas: EDS acoplada ao MEV, DRX, MET, DLS, PZ e UV-visível. Adicionalmente, empregou-se a técnica de SDS-PAGE, com o objetivo de verificar a possível formação de corona proteica na superfície das partículas, fator determinante para sua internalização celular. Todas as análises foram conduzidas em conformidade com as diretrizes da norma ISO 109337, assegurando padronização e controle de qualidade.

O INS 551 utilizado neste estudo foi obtido de um fornecedor certificado, que fornece certificados de análise contendo informações gerais sobre o tamanho e a pureza das partículas. Entretanto, optou-se por realizar uma caracterização físico-química detalhada sob condições biologicamente relevantes, uma vez que as análises comumente realizadas pelos fabricantes nem sempre refletem o comportamento real do material em sistemas biológicos, como meios de cultura celular, pois geralmente descrevem as propriedades das partículas no estado seco, sem considerar aspectos fundamentais como estabilidade coloidal e agregação. Essa caracterização mostrou-se fundamental, considerando a escassez de dados sobre o desempenho do INS 551 em ambientes que simulam o trato gastrointestinal (DA CRUZ *et al.*, 2022; GRACE, 2019; HUANG *et al.*, 2022; SAHANI *et al.*, 2021). Essa dissertação preenche essa lacuna ao estabelecer uma correlação confiável entre as propriedades físico-químicas das NPs e seus efeitos biológicos, confirmando os dados fornecidos pelos fabricantes e oferecendo novos insights sobre o comportamento do INS 551 em meios de cultura. Nesse contexto, as análises iniciais buscaram validar a composição elementar e a pureza do material.

A análise elementar do INS 551 por EDS confirmou a presença de O e Si, compatíveis com a composição típica de SiO_2 . A amostra apresentou elevada pureza (100%), sem indícios de contaminantes, o que representa um aspecto essencial para sua utilização como aditivo alimentar (ANVISA, 2020; YOUNES *et al.*, 2018). Esses resultados estão em consonância com as exigências regulatórias, que estabelecem níveis mínimos de impurezas, sobretudo de metais pesados, a fim de assegurar a segurança do consumidor (ANVISA, 2023b; FDA, 2025). Após a confirmação da composição elementar e da elevada pureza, foi realizada a análise da estrutura cristalina para complementar a caracterização físico-química do INS 551.

A análise da estrutura cristalina por DRX confirmou que o INS 551 apresenta natureza amorfa, evidenciada pelo halo difuso e largo no intervalo entre 15° e 32° (2θ), sem a presença de picos cristalinos definidos. Esse padrão é característico da sílica amorfa. A ausência de cristalinidade é especialmente relevante, uma vez que órgãos reguladores como a FDA e a EFSA autorizam exclusivamente o uso de SAS em aplicações alimentares, devido à sua inércia química e baixo potencial tóxico (FDA, 2021; GOMES *et al.*, 2018; YOUNES *et al.*, 2018).

Tanto o EDS quanto o DRX foram realizados com a amostra em pó. No entanto, para aplicação em modelos celulares, torna-se necessário dispersar as NPs em meio líquido. A literatura ainda não apresenta um consenso definido quanto ao protocolo mais adequado para a preparação de INS 551 em ensaios *in vitro* (BIANCHI *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2024). Alguns trabalhos sugerem a aplicação de ultrassonicação como estratégia para reduzir o diâmetro médio das partículas e limitar a formação de aglomerados (CHENG *et al.*, 2021; SUMITOMO *et al.*, 2018), outros indicam que a simples agitação mecânica já é suficiente para gerar suspensões estáveis (NOR-AZMAN *et al.*, 2024). Essas discrepâncias metodológicas podem estar relacionadas às diferenças intrínsecas entre as NPs de SAS utilizadas (grau alimentício ou grau industrial), dentre essas diferenças estão: porosidade, área de superfície, grau de hidrofobicidade, entre outras coisas. Todos esses fatores influenciam diretamente no processo de dispersão (ANASTASIADIS *et al.*, 2022; BUSHUEV, 2025; TADANO *et al.*, 2014).

Por conta disso, foram testados dois protocolos distintos: (Dispersão A) aplicação de ultrassonicação para promover maior desaglomeração das partículas (VIKASH *et al.*, 2020); e (Dispersão B) homogeneização por agitação mecânica (ZHANG *et al.*, 2023). A utilização de ambos os protocolos foi considerada necessária não apenas diante da falta de padronização nos estudos existentes (MOTA *et al.*, 2025), mas também para garantir a comparabilidade dos resultados com investigações anteriores (BRAND *et al.*, 2021) e assegurar que uma parcela representativa das partículas permanecesse dentro da faixa nanométrica.

A análise por DLS evidenciou diferenças significativas no comportamento hidrodinâmico INS 551 em função dos protocolos de dispersão empregados. Em sua forma inicial, sem dispersão, observou-se elevado grau de agregação em todos os meios avaliados, no qual os aglomerados atingiram dimensões superiores a 4 μm , configurando sistemas coloidais instáveis, devido as interações atrativas desequilibradas, como forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (RODRIGUEZ-LOYA *et al.*, 2023). A aplicação da ultrassonicação (Dispersão A) promoveu uma grande redução do diâmetro médio das partículas e do PDI, originando uma suspensão mais homogênea, com população predominante abaixo de 300 nm (PDI <0,2) (LI *et al.*, 2006; SUMITOMO *et al.*, 2018). Já a dispersão por agitação

mecânica (Dispersão B) preservou uma distribuição bimodal, composta por NPs associadas a agregados em escala micrométrica (~2000 nm), consistente com o perfil encontrado em aditivos de grau alimentício, que tipicamente apresentam frações nas escalas micro e nanométrica (BARAHONA *et al.*, 2016; LOOSLI 2017; PETERS *et al.*, 2012; SUMITOMO *et al.*, 2018).

As medições de PZ de ambos os protocolos de dispersão revelaram que suspensões em água destilada apresentaram elevada estabilização eletrostática, enquanto as suspensões em meios de cultura celular apresentaram uma queda expressiva do PZ. Esse efeito pode ser atribuído à blindagem iônica promovida pelos eletrólitos presentes, à adsorção de biomoléculas (DIETZ *et al.*, 2025; HAN *et al.*, 2025) (em especial proteínas) levando a formação da coroa proteica (LEE *et al.*, 2020; MARICHAL *et al.*, 2020) e às alterações de carga superficial induzidas pelo pH (DE OLIVEIRA *et al.*, 2023; HUNTER, 2001; SAPUTRA *et al.*, 2022). Essa instabilidade em condições fisiológicas tem implicações diretas para a reatividade e a biodisponibilidade das partículas (DUSSERT *et al.*, 2020; IRIARTE-MESA *et al.*, 2023).

As análises realizadas por MET e MEV evidenciaram a presença de algumas partículas com tamanho inferior a 100 nm, embora também tenha sido observada uma população constituída por agregados com morfologia característica de sílica amorfa, em conformidade com achados previamente descritos (DEKKERS *et al.*, 2011; MOTA *et al.*, 2025). A caracterização multimodal permitiu integrar informações sobre estabilidade coloidal, distribuição de tamanho e aspectos morfológicos, fornecendo uma base sólida para a interpretação das respostas biológicas. De forma relevante, ambos os protocolos de dispersão (A e B) preservaram uma fração em nanoescala, elemento essencial para a avaliação toxicológica, pois contempla desde NPs individuais até agregados mais complexos, simulando condições realistas de exposição alimentar (DONG *et al.*, 2020; MIAO *et al.*, 2024; MURUGADOSS *et al.*, 2017; ZAITER *et al.*, 2022). Concluída a caracterização físico-química do INS 551, foram conduzidos ensaios de qualidade no cultivo celular, etapa preliminar antes das avaliações biológicas de interação com as NPs.

A verificação da integridade da pipetagem antes dos ensaios biológicos constitui uma etapa essencial para assegurar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos dados

experimentais. A precisão nesse processo é determinante, uma vez que variações de volume ou composição podem gerar resultados inconsistentes e dificultar a interpretação dos efeitos biológicos (PUSHPARAJ, 2020). A calibração e validação dos instrumentos de pipetagem reduzem erros sistemáticos, garantindo que as concentrações celulares estejam de acordo com os parâmetros estabelecidos e, assim, favorecendo a comparabilidade entre ensaios (GUAN *et al.*, 2023). Essa prática também possibilita identificar discrepâncias antes da exposição biológica, prevenindo falhas metodológicas que poderiam comprometer a avaliação da segurança do aditivo (GRANJEIRO *et al.*, 2024).

Na análise de integridade da pipetagem (ABNT NBR ISO 20391-2), os fatores de diluição testados apresentaram alta reprodutibilidade, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,9972 para Caco-2 e 0,9977 para FGH, além de inclinações $\beta_{\text{pipetagem}}$ próximas de 1 (0,9730 e 1,0080, respectivamente). Esses resultados se enquadram nos limites de aceitação descritos por Guan *et al.*, (2023) e Pushparaj (2020), confirmando que protocolos padronizados podem reduzir a variabilidade técnica em estudos de nanotoxicologia em mais de 30%. A manutenção da precisão é crucial em estudos com suspensões de NPs, visto que até desvios volumétricos sutis podem impactar de forma expressiva as concentrações administradas e, portanto, os efeitos celulares observados.

Com base nessa validação metodológica inicial, procedeu-se à determinação do PDL, parâmetro essencial para compreender a taxa proliferativa das linhagens estudadas. Para isso, o PDL das células FGH e Caco-2 foi monitorado em 24 h após o plaqueamento e em 24, 48 e 72 h após a exposição ao INS 551, nas concentrações de 19,82 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mostraram que ambas as células mantiveram sua taxa de duplicação, sem redução significativa após o tratamento. Esse achado está em consonância com estudos prévios que avaliaram a interação de sílica amorfa com células intestinais, indicando que NPs de SAS não alteram de forma marcante a capacidade proliferativa dessas linhagens (HALAMODA-KENZAOUI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2014). De maneira semelhante, Piechulek *et al.*, (2019) relataram que NPs de SAS de grau alimentar podem ser bem toleradas pelas células intestinais, não comprometendo o ciclo celular nas concentrações empregadas em alimentos. Tal ausência de alteração no PDL pode estar associada ao fato INS 551 ser regulado

para garantir compatibilidade biológica, embora não se descartem possíveis efeitos em condições de exposição crônica ou em cenários mais extremos, que poderiam afetar outros aspectos da biologia celular, como sinalização intracelular e interação com a microbiota intestinal.

Após a caracterização físico-química do INS 551, bem como a validação metodológica por meio dos ensaios de integridade de pipetagem e determinação do PDL, iniciaram-se as análises biológicas nas linhagens FGH e Caco-2, com o objetivo de investigar potenciais efeitos toxicológicos. A triagem preliminar de viabilidade, conduzida pelo ensaio de MTT e comparando os protocolos de dispersão A e B, não evidenciou diferenças estatisticamente significativas nas respostas das células Caco-2 e FGH. Devido à ausência de diferenças significativas entre os protocolos, as etapas subsequentes (xCELLigence, ROS, MET, MEV e mediadores inflamatórios) foram conduzidas exclusivamente com a Dispersão A, que apresentou melhor representação da fração <100 nm. Essa subpopulação em nanoescala é de especial interesse toxicológico, em razão de seu elevado potencial de internalização celular e da atividade biológica já documentada na literatura (ATHINARAYANAN *et al.*, 2022; DEKKERS *et al.*, 2011; DUSSERT *et al.*, 2020; ZAITER *et al.*, 2022).

Nessa etapa, as análises de viabilidade celular por MTT e xCELLigence confirmaram a ausência de citotoxicidade significativa do INS 551 nas concentrações avaliadas (19,82 a 200 µg/mL). O ensaio de MTT foi conduzido nas linhagens Caco-2 e FGH, após 72 h de exposição, e na linhagem L929, com 24 h de exposição, em conformidade com a norma ISO 10993-5:2009, que reconhece esse modelo como padrão internacional para triagem de toxicidade aguda de biomateriais (KOMERI *et al.*, 2022). O ensaio de xCELLigence, realizado nas linhagens Caco-2 e FGH, corroborou esses resultados, evidenciando que a exposição ao INS 551 não comprometeu de forma relevante a adesão, a proliferação ou o crescimento celular ao longo de 72 h. Em conjunto, os achados demonstram a biocompatibilidade aguda do material e reforçam sua segurança em contextos de contato celular de curto prazo.

Esses achados estão em concordância com estudos anteriores que descrevem baixa toxicidade da SAS de grau alimentício em modelos *in vitro* (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016; HEMPT *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2014; ZAITER *et al.*, 2022). No entanto, contrastam com evidências de citotoxicidade relatadas em células Caco-2

expostas à sílica coloidal ou a variantes sintéticas sob condições experimentais distintas, nas quais foi observada redução da viabilidade após 24 h de exposição, nas concentrações de 32 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente (TARANTINI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013). Essas discrepâncias são atribuídas principalmente às diferenças físico-químicas entre as formas de sílica, em especial quanto à cristalinidade, modificações de superfície e estado de hidratação, fatores reconhecidamente determinantes para a biocompatibilidade e o potencial citotóxico (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016; KIANFAR, 2025).

Com base nos resultados de viabilidade, investigou-se também a produção de ROS como possível mecanismo de toxicidade associado ao INS 551. Nas concentrações mínima (19,82 µg/mL) e máxima (200 µg/mL) testadas, não foi detectado aumento significativo na geração de ROS em ambas as linhagens celulares, indicando que, nas condições avaliadas, o INS 551 não induz estresse oxidativo relevante. Esse perfil difere do observado para NPs metálicas, como as de óxido de zinco e prata, amplamente descritas pela capacidade de gerar elevados níveis de ROS (YAZDIMAMAGHANI *et al.*, 2019).

A ausência de indução oxidativa sugere que o INS 551 possivelmente não apresenta sítios de superfície redox-ativos (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016; HEMPT *et al.*, 2020; KIANFAR, 2025). No entanto, estudos recentes indicam que seu potencial tóxico pode estar mais relacionado a mecanismos alternativos, incluindo estresse lisossômico, respostas pró-inflamatórias, autofagia, efeitos cito e genotóxicos ou indução de apoptose, em vez das vias oxidativas clássicas (DONG *et al.*, 2020; RIBEIRO, 2023). Essa distinção mecanística ajuda a explicar a manutenção da viabilidade celular observada, mesmo na presença de internalização das partículas.

As micrografias de MET forneceu evidência direta dessa internalização, mostrando que as partículas de INS 551 foram incorporadas pelas linhagens Caco-2 e FGH após 72 h de exposição a 200 µg/mL. As partículas (estruturas com alta densidade eletrônica) localizaram-se predominantemente em vesículas citoplasmáticas delimitadas por membrana sem indícios de penetração nuclear. Essa organização compartimentalizada sugere que a internalização do INS 551 ocorre predominantemente por endocitose, com posterior acúmulo em vesículas endossomais e lisossômicas, padrão já relatado para NMs de sílica (SOUSA DE

ALMEIDA *et al.*, 2024; YE *et al.*, 2017), e compatível com a hipótese de que o estresse lisossômico pode representar um mecanismo relevante de toxicidade.

De forma complementar, a análise por MEV evidenciou alterações morfológicas graduais e dependentes da concentração, especialmente na borda em escova das células Caco-2. Observou-se uma progressão desde o alongamento das microvilosidades em 19,82 µg/mL até a completa desorganização da superfície apical em 200 µg/mL, fenômeno descrito como “ponto de inflexão” (*tipping point*) nas interações entre NPs e epitélios (VINCENTINI *et al.*, 2022). Nas células FGH, destacaram-se modificações fibrilares e observa-se agregados extracelulares em concentrações mais elevadas, indicando possíveis interações do INS 551 com a matriz extracelular, com potencial impacto em processos de remodelação tecidual em exposições prolongadas (HAKKINEN *et al.*, 2011). Vale ressaltar que essas alterações estruturais ocorreram mesmo na manutenção da viabilidade celular, conforme avaliado pelos ensaios de MTT e de impedância, sugerindo que os efeitos observados refletem mais mudanças morfológicas do que citotoxicidade imediata.

Essa perturbação na arquitetura celular, especialmente na interface que medeia a comunicação com o meio externo, levanta a hipótese de que a interação com as NPs poderia também modular respostas funcionais, como as vias de sinalização inflamatória. De fato, ao investigar o potencial inflamatório do INS 551, observou-se um perfil de imunomodulação em vez de uma resposta inflamatória clássica. Na maior concentração testada (200 µg/mL), houve uma diminuição marcante nos níveis de eotaxina, uma citocina ligada ao recrutamento de eosinófilos, e de IP-10, crucial para a ativação de células T. Essa supressão de mediadores-chave sugere que o aditivo pode influenciar a comunicação celular e atenuar a regulação inflamatória. Tal efeito está em consonância com a literatura, que já aponta a capacidade de NPs de sílica modularem a secreção de citocinas de forma dose-dependente (BARBERO *et al.*, 2017; BREZNAN *et al.*, 2017; RIBEIRO, P. C., 2023).

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que este estudo contribuiu significativamente para o entendimento dos efeitos do INS 551 no trato gastrointestinal. Verificou-se que, em linhagens celulares como FGH e Caco-2, o INS 551 não causou toxicidade celular relevante, mesmo em concentrações elevadas. Além disso, foram definidos limiares para a captação celular e identificadas alterações

morfológicas, informações que podem ser fundamentais para futuras avaliações regulatórias do uso desse aditivo.

Os resultados do perfil de mediadores inflamatórios nas células FGH expostas à concentração de 200 µg/mL de INS 551 por 72 h revelaram um cenário complexo de modulação imunológica, e não uma ativação inflamatória clássica. Observou-se uma tendência de aumento nas concentrações de IL-15, IL-6, IL-9, IL-5 e IL-1β, embora sem significância estatística quando comparadas ao controle. Este perfil sugere um potencial, porém discreto, estimulação de vias pró-inflamatórias, alinhando-se com estudos que demonstram a capacidade de NPs de SAS, mesmo de grau alimentício, de interagir com receptores celulares e modular sinalizações intracelulares. A IL-1β, por exemplo, é uma citocina-chave na inflamação pirogênica, frequentemente associada à ativação do inflamassoma NLRP3 por materiais particulados (DONG *et al.*, 2020; RIBEIRO, 2023). Da mesma forma, a IL-6 é um mediador central na resposta de fase aguda. A ausência de significância estatística pode indicar que o estímulo foi subcrítico ou que as células FGH, como fibroblastos, possuem um limiar de ativação mais elevado para essas citocinas em particular.

Em contrapartida, e de forma mais impactante, registrou-se uma diminuição significativa na concentração da eotaxina. Esta quimiocina é fundamental para o recrutamento seletivo de eosinófilos e está classicamente associada a respostas alérgicas e à patogênese de doenças como a asma (GRAF *et al.*, 2025; SANTOS *et al.*, 2025). A supressão de seu nível pode indicar um efeito imunossupressor localizado do INS 551, possivelmente através da interferência na sinalização de NF-κB ou de outras vias de transcrição proinflamatórias (DILEEPAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2023). Barbero *et al.* (2017) e Breznan *et al.* (2017) também relataram perfis mistos de modulação de citocinas por NPs de SAS, onde algumas vias eram suprimidas enquanto outras eram levemente estimuladas, destacando que a resposta imune a NMs é altamente contextual e dependente do tipo celular, do tempo de exposição e das propriedades físico-químicas da partícula.

A interpretação integrada desses dados, tendência de aumento não significativo de citocinas pró-inflamatórias concomitante à redução de um mediador-chave como a eotaxina, aponta para um fenômeno de imunomodulação em vez de toxicidade inflamatória aguda. Este resultado é consistente com a manutenção da viabilidade

celular observada nos ensaios de MTT e xCELLigence, sugerindo que o INS 551, na concentração e no modelo testado, não desencadeia uma resposta citotóxica ou hiperinflamatória. No entanto, a alteração no microambiente de citocinas levanta questões sobre os impactos sutis e de longo prazo dessa modulação. Em um cenário de exposição crônica, tal perfil poderia potencialmente interferir na homeostase tecidual ou na resposta a patógenos, um aspecto que merece investigação em modelos mais complexos, como co-culturas com células imunológicas ou em estudos *in vivo*, para elucidar completamente as implicações para a segurança alimentar (DONG *et al.*, 2020; MURUGADOSS *et al.*, 2017).

No entanto, a formação de agregados em determinadas condições e a modulação da resposta inflamatória indicam que os efeitos a longo prazo do consumo do INS 551 são complexos e ainda não totalmente compreendidos. A falta de padronização nos ensaios toxicológicos, bem como a variabilidade nas características físico-químicas das SAS comercializadas, representam desafios importantes para uma avaliação de segurança mais abrangente.

Apesar dos resultados desse estudo fornecerem uma base sólida para a compreensão das interações celulares envolvendo o INS 551, é fundamental reconhecer limitações importantes que ainda persistem. Entre elas, destacam-se a ausência de dados relativos à exposição crônica e a falta de avaliação detalhada do potencial inflamatório em células Caco-2.

Para avançar o conhecimento nessa área, futuras investigações devem adotar abordagens mais sofisticadas e realistas, priorizando modelos que reproduzam com maior fidelidade o ambiente biológico. É essencial integrar o uso de co-culturas tridimensionais, que combinam células epiteliais e imunológicas, bem como a incorporação da microbiota intestinal, aliadas a uma análise minuciosa do perfil inflamatório, com monitoramento de marcadores como citocinas e a ativação do fator NF- κ B. Tais estratégias são determinantes para esclarecer se as partículas de INS 551 podem desencadear uma inflamação silenciosa ou comprometer a integridade da barreira intestinal.

Além disso, a inclusão de dados sobre exposição prolongada em modelos fisiologicamente relevantes é imprescindível para uma avaliação abrangente dos riscos e benefícios associados ao aditivo.

Em suma, embora este estudo represente um avanço significativo na caracterização e avaliação da citotoxicidade do aditivo E551, oferecendo contribuições valiosas para as discussões regulatórias, é essencial que pesquisas futuras aprofundem a investigação dos impactos crônicos e imunomoduladores do INS 551 na saúde humana. Essa abordagem integrativa permitirá o desenvolvimento de diretrizes de uso mais seguras e fundamentadas para a indústria alimentícia.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o INS 551 não induziu toxicidade celular significativa nos modelos avaliados, mesmo em concentrações elevadas de até 200 µg/mL. A caracterização físico-química, por sua vez, confirmou a natureza amorfa das partículas e evidenciou a presença de agregados em determinadas condições experimentais, ressaltando assim o papel dos meios de cultura na dispersão e no comportamento das NPs. Além disso, a análise da adsorção proteica revelou a formação de uma corona proteica, fator fundamental para a biodisponibilidade e as interações biológicas desses materiais.

Ensaio de viabilidade celular e monitoramento por bioimpedância em tempo real indicaram que o INS 551 não prejudicou a integridade celular nem interferiu na proliferação das linhagens avaliadas, mantendo a viabilidade acima de 75%. Além disso, as micrografias de MET mostraram a presença do INS 551 em vesículas citoplasmáticas, sem evidências de penetração nuclear. Já as micrografias de MEV revelaram alterações morfológicas dependentes da concentração, incluindo a desorganização das microvilosidades nas células Caco-2 e o aumento da rugosidade superficial nas células FGH. Os ensaios de ROS por sua vez não indicaram estresse oxidativo significativo na maioria das condições testadas, no entanto, houve modulação da resposta inflamatória, com a redução de citocinas como eotaxina e IP-10 em concentrações mais elevadas. Isso sugere que a exposição prolongada ao INS 551 pode afetar mecanismos celulares ainda pouco compreendidos.

Diante desses achados, destaca-se a importância da padronização dos protocolos de dispersão para garantir reprodutibilidade e precisão em testes nanotoxicológicos, considerando que a distribuição do tamanho das partículas impacta diretamente as respostas celulares.

Por fim, embora os resultados representem um avanço importante na caracterização e avaliação da citotoxicidade do INS 551, fornecendo informações valiosas para futuras discussões sobre sua regulamentação e segurança, é fundamental realizar novas investigações. Tais estudos são imprescindíveis para esclarecer os impactos crônicos e os potenciais efeitos imunomoduladores dessas NPs na saúde humana, contribuindo assim para a formulação de diretrizes

regulatórias mais rigorosas e seguras para a aplicação do INS 551 na indústria alimentícia.

8. BIBLIOGRAFIA

ALISSON, E. **Formato influencia propriedades de nanomateriais.** *FAPESP*. 2019.

ALMEIDA-DA-SILVA, C. L. C. *et al.* **Interactions between silica and titanium nanoparticles and oral and gastrointestinal epithelia: Consequences for inflammatory diseases and cancer.** *Heliyon*, v. 9, nº 3, p. e14022, 2023. ISSN: 24058440, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14022.

ALT, K.; AL-AHMAD, A.; HUJOEL, P. **Nutrition and Health in Human Evolution—Past to Presentation.** *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, v. 14, nº 17, 2022. DOI: 10.3390/nu14173594.

AMATO, K. R. *et al.* **Predigestion as an Evolutionary Impetus for Human Use of Fermented Food.** *Current Anthropology*, p. S000–S000, 2021. DOI: 10.1086/715238.

ANASTASIADIS, S. H. *et al.* **How the Physicochemical Properties of Manufactured Nanomaterials Affect Their Performance in Dispersion and Their Applications in Biomedicine: A Review.** *Nanomaterials*, v. 12, nº 3, p. 552, 2022. ISSN: 2079-4991, DOI: 10.3390/nano12030552.

ANVISA. **Informa n. 156 – Publicada a RDC Anvisa n. 239 que estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares.** Disponível em: <https://www.conass.org.br/conass-informa-n-156-publicada-rdc-anvisa-n-239-que-estabelece-os-aditivos-alimentares-e-coadjuvantes-de-tecnologia-autorizados-para-uso-em-suplementos-alimentares/> . Acesso em: 03/fev./25

ANVISA. **Instrução Normativa - IN nº 211, de 01/03/2023.** 2023a.

ANVISA. **Resolução RDC nº 778, de 1º de março de 2023.** 2023b. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-778-de-1-de-marco-de-2023-468499613>. Acesso em: 03/fev./25

ASAD, S.; JACOBSEN, A.-C.; TELEKI, A. **Inorganic nanoparticles for oral drug delivery: opportunities, barriers, and future perspectives.** *Current Opinion in Chemical Engineering*, v. 38, p. 100869, 2022. ISSN: 22113398, DOI: 10.1016/j.coche.2022.100869.

ATHINARAYANAN, J. *et al.* **Co-exposure to commercial food product ingredient E341 and E551 triggers cytotoxicity in human mesenchymal stem cells.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, n° 12, p. 33264–33274, 2022. ISSN: 1614-7499, DOI: 10.1007/s11356-022-24497-1.

BADEM, A. **The Effects of Fire in Human Life and in the Cuisine from the Paleolithic to the Modern Age.** *Journal of Ecohumanism*, v. 3, n° 6, p. 269–293, 2024. DOI: 10.62754/joe.v3i6.4002.

BARAHONA, F. *et al.* **Multimethod approach for the detection and characterisation of food-grade synthetic amorphous silica nanoparticles.** *Journal of Chromatography A*, v. 1432, p. 92–100, 2016. ISSN: 00219673, DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.058.

BARBERO, F. *et al.* **Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System.** *Seminars in Immunology*, v. 34, p. 52–60, 2017. ISSN: 10445323, DOI: 10.1016/j.smim.2017.10.001.

BEHZADI, S. *et al.* **Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell.** *Chemical Society Reviews*, v. 46, n° 14, p. 4218–4244, 2017. ISSN: 0306-0012, DOI: 10.1039/C6CS00636A.

BRAND, W. *et al.* **Issues currently complicating the risk assessment of synthetic amorphous silica (SAS) nanoparticles after oral exposure.** *Nanotoxicology*, p. 1–29, 2021. DOI: 10.1080/17435390.2021.1931724.

BREZNAN, D. *et al.* **Differential cytotoxic and inflammatory potency of amorphous silicon dioxide nanoparticles of similar size in multiple cell lines.** *Nanotoxicology*, v. 11, n° 2, p. 223–235, 2017. ISSN: 1743-5390, DOI: 10.1080/17435390.2017.1287313.

BIANCHI, M. *et al.* **Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica Nanoparticles Differentially Affect Cell Responses to LPS in Human Macrophages.** *Nanomaterials*, v. 10, n° 7, p. 1395, 2020. ISSN: 2079-4991, DOI: 10.3390/nano10071395.

BUSHUEV, Y. G. **Effects of Size and Porosity on the Hydrophobicity of Hierarchical Nanoparticles.** *Nano Letters*, v. 25, nº 8, p. 3351–3356, 2025. DOI: 10.1021/acs.nanolett.5c00058.

CALLISTERJÚNIOR, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução.** 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CAMPBELL, E. S. *et al.* **Compatibility of Caco-2 cells with Simulated Intestinal Fluid-Predicting Permeability.** *British Journal of Pharmacy*, v. 8, nº 2, 2023. ISSN: 2058-8356, DOI: 10.5920/bjpharm.1403.

CAO, Y. *et al.* **Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 9-9, p. 295–310, 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.006.

CAPOCASA, M.; VENIER, D. **A bio-cultural tale of the past, present and future of human nutrition.** *PubMed*, v. 102, 2024. DOI: 10.4436/jass.10206.

CARDOZA, C. *et al.* **Emerging applications of nanotechnology in cosmeceutical health science: Latest updates.** *Health Sciences Review*, v. 4, p. 100051, 2022. ISSN: 27726320, DOI: 10.1016/j.hsr.2022.100051.

CHALKIDI, N.; PARASKEVA, C.; KOLIARAKI, V. **Fibroblasts in intestinal homeostasis, damage, and repair.** *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022. ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2022.924866.

CHEN, J. *et al.* **Emerging Nanoparticles in Food: Sources, Application, and Safety.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 71, nº 8, p. 3564–3582, 2023. ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/acs.jafc.2c06740.

CHEN, L. *et al.* **The toxicity of silica nanoparticles to the immune system.** *Nanomedicine*, v. 13, nº 15, p. 1939–1962, 2018. ISSN: 1743-5889, DOI: 10.2217/nnm-2018-0076.

CHENG, X. *et al.* **Behaviors and physical mechanism of ceftazole sodium de-agglomeration driven by ultrasound.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 74, p. 105570, 2021. ISSN: 13504177, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105570.

COMISSÃO EUROPEIA. **Synthetic amorphous silicon dioxide (NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204): characterisation and physico-chemical properties: JRC repository: NM-series of representative manufactured nanomaterials.** Publications Office, 2013. 201 p. ISBN: 9789279323232.

CRITTENDEN, A. N.; SCHNORR, S. L. **Current views on hunter-gatherer nutrition and the evolution of the human diet.** *American Journal of Physical Anthropology*, v. 162, nº S63, p. 84–109, 2017. DOI: 10.1002/ajpa.23148.

CRUZ SCHNEID, A. DA *et al.* **Colloidal stability and degradability of silica nanoparticles in biological fluids: a review.** *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 102, nº 1, p. 41–62, 2022. ISSN: 0928-0707, DOI: 10.1007/s10971-021-05695-8.

CUNHA, M. C. Da; PAULA, B. M. D. **ADITIVOS ALIMENTARES E O IMPACTO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA E SEUS EFEITOS SOBRE A SAÚDE.** *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, v. 11, nº 4, 2023. DOI: 10.16891/2317-434x.v11.e3.a2023.pp3079-3091.

DAL-CHERI, B. K. A. *et al.* **Caracterização de nanopartículas de sílica amorfa para ensaios de citotoxicidade.** 2021.

DEKKERS, B. L.; BOOM, R. M.; GOOT, A. J. VAN DER. **Structuring processes for meat analogues.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 81, p. 25–36, 2018. ISSN: 09242244, DOI: 10.1016/j.tifs.2018.08.011.

DEKKERS, S. *et al.* **Presence and risks of nanosilica in food products.** *Nanotoxicology*, v. 5, nº 3, p. 393–405, 2011. ISSN: 1743-5390, DOI: 10.3109/17435390.2010.519836.

DEY, S.; SAMADDER, A.; NANDI, S. **Exploring Current Role of Nanotechnology Used in Food Processing Industry to Control Food Additives and their**

Biochemical Mechanisms. *Current Drug Targets*, v. 23, n° 5, p. 513–539, 2022. ISSN: 13894501, DOI: 10.2174/1389450123666211216150355.

DIAS, L. M. *et al.* **Unlocking Histatin Potential against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilms: Targeting the Extracellular Matrix While Preserving Oral Cell Integrity.** *ACS Omega*, v. 10, n° 25, p. 27011–27022, 2025. ISSN: 2470-1343, DOI: 10.1021/acsomega.5c02108.

DIETZ, L. *et al.* **Plasma protein corona on silica nanoparticles enhances exocytosis.** *Biomaterials Science*, v. 13, n° 13, p. 3532–3543, 2025. ISSN: 2047-4830, DOI: 10.1039/D4BM01189A.

DILEEPAN, M. *et al.* **Regulation of Eosinophil Recruitment and Allergic Airway Inflammation by Tropomyosin Receptor Kinase A.** *The Journal of Immunology*, v. 204, n° 3, p. 682–693, 2020. ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1900786.

DONG, X. *et al.* **The Size-dependent Cytotoxicity of Amorphous Silica Nanoparticles: A Systematic Review of in vitro Studies.** *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 15, p. 9089–9113, 2020. ISSN: 1178-2013, DOI: 10.2147/IJN.S276105.

DUSSERT, F. *et al.* **Toxicity to RAW264.7 Macrophages of Silica Nanoparticles and the E551 Food Additive, in Combination with Genotoxic Agents.** *Nanomaterials*, v. 10, n° 7, p. 1418, 2020. ISSN: 2079-4991, DOI: 10.3390/nano10071418.

ENGELMANN, W.; LEAL, W. S. D. **A SOCIEDADE NANOTECNOLÓGICA E NOVOS DESAFIOS DO DIREITO AMBIENTAL: ENTRE A SUSTENTABILIDADE E A ECONOMIA CIRCULAR PARA GESTÃO DO (NANO) RISCO.** *Revista da AJURIS*, v. 27, n° 149, 2020.

ERNST, L. M. *et al.* **The Interactions between Nanoparticles and the Innate Immune System from a Nanotechnologist Perspective.** *Nanomaterials*, v. 11, n° 11, p. 2991, 2021. DOI: 10.3390/nano11112991.

FADL, A.; LEASK, A. **Hiding in Plain Sight: Human Gingival Fibroblasts as an Essential, Yet Overlooked, Tool in Regenerative Medicine.** *Cells*, v. 12, n° 16, p. 2021, 2023. ISSN: 2073-4409, DOI: 10.3390/cells12162021.

FDA. **GRAS Notice (GRN) No. 996** <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory> Re: **GRAS Notice for Synthetic Amorphous Silica as a Carrier in White Sugar.** 2021.

FDA. **Title 21 – Food and Drugs, Chapter I – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Subchapter B – Food for Human Consumption, Part 172 – Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption, Section 172.480 – Silicon Dioxide.** 2025. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-172/subpart-E/section-172.480>. Acesso em: 17/jun./25

FITZPATRICK, M. E. B.; KESHAV, S. **Structure and function of the gastrointestinal tract.** *Oxford Textbook of Medicine*, p. C15.1-C15.1.P42, 2020. DOI: 10.1093/med/9780198746690.003.0284.

FLOOR, E. *et al.* **Development of a Caco-2-based intestinal mucosal model to study intestinal barrier properties and bacteria–mucus interactions.** *Gut Microbes*, v. 17, n° 1, 2025. ISSN: 1949-0976, DOI: 10.1080/19490976.2024.2434685.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. **The safety of nanostructured synthetic amorphous silica (SAS) as a food additive (E 551).** *Archives of Toxicology*, v. 90, n° 12, p. 2885–2916, 2016. ISSN: 0340-5761, DOI: 10.1007/s00204-016-1850-4.

GOMES, C.; ENGELMANN, W. **NANOTECNOLOGIA E A VULNERABILIDADE DOS TRABALHADORES EM SEU AMBIENTE LABORATIVO: OS DESAFIOS GERADOS PELA IN (EXISTENCIA) DE NORMAS PROTETIVAS TRABALHISTAS.** *Revista de Direitos Fundamentais nas Relações do Trabalho, Sociais e Empresariais*, 2018.

GOMES, L. S.; FURTADO, A. C. R.; SOUZA, M. C. **Silica and its Peculiarities.** *Revista Virtual de Química*, v. 10, n° 4, p. 1018–1038, 2018. ISSN: 19846835, DOI: 10.21577/1984-6835.20180072.

GRACE. **PERKASIL SM660**. 2019.

GRAF, L. M.; RADTKE, D.; VOEHRINGER, D. **Regulation of eosinophil recruitment and heterogeneity during allergic airway inflammation**. *Frontiers in Allergy*, v. 6, 2025. ISSN: 2673-6101, DOI: 10.3389/falgy.2025.1585142.

GRANJEIRO, J. M. *et al.* **CIÊNCIAS REGULATÓRIAS: NANOTECNOLOGIAS, REGULAÇÃO BASEADA EM EVIDÊNCIAS**. ANAIS DO XXI SEMINÁRIO INTERNACIONAL NANOTECNOLOGIAS, SOCIEDADE E MEIO AMBIENTE. Casa Leiria, 2024. DOI: 10.29327/5457536.1-8.

GUAN, X. L. *et al.* **Assessing variations in manual pipetting: An under-investigated requirement of good laboratory practice**. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, v. 30, p. 25–29, 2023. DOI: 10.1016/j.jmsacl.2023.09.001.

GULLIAMS, T. G. **Structure Defines Function**. *Oxford University Press eBooks*, p. 19–38, 2019. DOI: 10.1093/med/9780190933043.003.0002.

GUO, Z. *et al.* **Silicon dioxide nanoparticle exposure affects small intestine function in an in vitro model**. *Nanotoxicology*, v. 12, nº 5, p. 485–508, 2018. DOI: 10.1080/17435390.2018.1463407.

HAKKINEN, K. M. *et al.* **Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices**. *Tissue Engineering Part A*, v. 17, nº 5–6, p. 713–724, 2011. ISSN: 1937-3341, DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0273.

HALAMODA-KENZAOU, B. *et al.* **Dispersion Behaviour of Silica Nanoparticles in Biological Media and Its Influence on Cellular Uptake**. *PLOS ONE*, v. 10, nº 10, p. e0141593–e0141593, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0141593.

HAN, Q. *et al.* **Silica Nanoparticle–Protein Aggregation and Protein Corona Formation Investigated with Scattering Techniques**. *ACS Applied Materials &*

Interfaces, v. 17, n° 5, p. 8574–8587, 2025. ISSN: 1944-8244, DOI: 10.1021/acsami.4c19591.

HEMPT, C. *et al.* **The impact of synthetic amorphous silica (E 551) on differentiated Caco-2 cells, a model for the human intestinal epithelium.** *Toxicology in Vitro*, v. 67, p. 104903, 2020. ISSN: 08872333, DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104903.

HEMPT, C. *et al.* **Investigating the effects of differently produced synthetic amorphous silica (E 551) on the integrity and functionality of the human intestinal barrier using an advanced in vitro co-culture model.** *Archives of Toxicology*, v. 95, n° 3, p. 837–852, 2021. ISSN: 0340-5761, DOI: 10.1007/s00204-020-02957-2.

HSU, S.-Y.; MORRIS, R.; CHENG, F. **Signaling Pathways Regulated by Silica Nanoparticles.** *Molecules*, v. 26, n° 5, p. 1398, 2021. DOI: 10.3390/molecules26051398.

HUANG, Y. *et al.* **Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 151, p. 113053, 2022. ISSN: 07533322, DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113053.

HUNTER, R. J. **Foundations of Colloid Science.** 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

IFTIKHAR, M. *et al.* **Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review.** *Food Research International*, v. 136, p. 109240, 2020. ISSN: 09639969, DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109240.

IRIARTE-MESA, C. *et al.* **Morphology-Dependent Interaction of Silica Nanoparticles with Intestinal Cells: Connecting Shape to Barrier Function.** *Nano Letters*, v. 23, n° 16, p. 7758–7766, 2023. ISSN: 1530-6984, DOI: 10.1021/acs.nanolett.3c00835.

JANJUA, T. I. *et al.* **Silica nanoparticles: A review of their safety and current strategies to overcome biological barriers.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 203, p. 115115, 2023. ISSN: 0169409X, DOI: 10.1016/j.addr.2023.115115.

KHAN, S. A. *et al.* **Characterization of nanoparticles in silicon dioxide food additive.** *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 41, n° 1, p. 9–21, 2024. ISSN: 1944-0049, DOI: 10.1080/19440049.2023.2297420.

KIANFAR, E. **Biocompatibility Study of Silica-Based Magnesium Composites: A Review.** *Trends in Sciences*, p. 9868, 2025. ISSN: 2774-0226, DOI: 10.48048/tis.2025.9868.

KNORR, D.; AUGUSTIN, M. A. **Preserving the food preservation legacy.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1–20, 2022. DOI: 10.1080/10408398.2022.2065459.

KOMERI, R.; KASOJU, N.; ANIL KUMAR, P. R. **In vitro cytotoxicity and cytocompatibility assays for biomaterial testing under regulatory platform.** *Biomedical Product and Materials Evaluation*. Elsevier, 2022. p. 329–353. DOI: 10.1016/B978-0-12-823966-7.00009-8.

KUMAR, A. **Food Preservation: Traditional and Modern Techniques.** *Acta Scientific Nutritional Health*, v. 3, n° 12, p. 45–49, 2019. DOI: 10.31080/asnh.2019.03.0529.

KUMARI, R. *et al.* **Regulation and safety measures for nanotechnology-based agri-products.** *Frontiers in genome editing*, v. 5, 2023. DOI: 10.3389/fgeed.2023.1200987.

LAMSON, N. G. *et al.* **Anionic nanoparticles enable the oral delivery of proteins by enhancing intestinal permeability.** *Nature Biomedical Engineering*, v. 4, n° 1, p. 84–96, 2019. DOI: 10.1038/s41551-019-0465-5.

LE, N. P. K.; ALTENBURGER, M. J.; LAMY, E. **Development of an Inflammation-Triggered In Vitro “Leaky Gut” Model Using Caco-2/HT29-MTX-E12 Combined with Macrophage-like THP-1 Cells or Primary Human-Derived Macrophages.**

International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n° 8, p. 7427, 2023. ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms24087427.

LEE, J. G. *et al.* **Adsorption of Myoglobin and Corona Formation on Silica Nanoparticles.** *Langmuir*, v. 36, n° 47, p. 14157–14165, 2020. ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c01613.

LI, D.; KANER, R. B. **Shape and Aggregation Control of Nanoparticles: Not Shaken, Not Stirred.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n° 3, p. 968–975, 2006. ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja056609n.

LIN, L.; ZHANG, J. **Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases.** *BMC Immunology*, v. 18, n° 1, 2017. DOI: 10.1186/s12865-016-0187-3.

LIU, X. *et al.* **Amorphous silica nanoparticles induce inflammation via activation of NLRP3 inflammasome and HMGB1/TLR4/MYD88/NF- κ B signaling pathway in HUVEC cells.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 404, p. 124050, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124050.

LOOSLI, F.; STOLL, S. **Effect of surfactants, pH and water hardness on the surface properties and agglomeration behavior of engineered TiO₂ nanoparticles.** *Environmental Science: Nano*, v. 4, n° 1, p. 203–211, 2017. ISSN: 20518161, DOI: 10.1039/c6en00339g.

MANNA, M. *et al.* **Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota.** *Foods*, v. 10, n° 11, p. 2861, 2021. DOI: 10.3390/foods10112861.

MARICHAL, L. *et al.* **Protein Corona Composition of Silica Nanoparticles in Complex Media: Nanoparticle Size does not Matter.** *Nanomaterials*, v. 10, n° 2, p. 240, 2020. ISSN: 2079-4991, DOI: 10.3390/nano10020240.

MARQUES DA SILVA, V. *et al.* **Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review.** *Nanomaterials*, v. 12, n° 14, p. 2392, 2022. DOI: 10.3390/nano12142392.

MCCLEMENTS, D. J. *et al.* **The role of the food matrix and gastrointestinal tract in the assessment of biological properties of ingested engineered nanomaterials (iENMs): State of the science and knowledge gaps.** *NanoImpact*, v. 3–4, p. 47–57, 2016. ISSN: 24520748, DOI: 10.1016/j.impact.2016.10.002.

MEBERT, A. M. *et al.* **Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 753–770, 2017. ISSN: 02786915, DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.054.

METWALLY, H.; KISHIMOTO, T. **Gut Microbiome Metabolites and the Intestinal Homeostasis.** *Journal of Clinical Research and Reports*, v. 15, n° 4, p. 1–6, 2024. DOI: 10.31579/2690-1919/371.

MIAO, C. *et al.* **The size-dependent in vivo toxicity of amorphous silica nanoparticles: A systematic review.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 271, p. 115910, 2024. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.115910.

MOTA, W. S. *et al.* **Nanometrology: particle sizing and influence on the toxicological profile.** *Frontiers in Nanotechnology*, v. 7, 2025. ISSN: 2673-3013, DOI: 10.3389/fnano.2025.1479464.

NOR-AZMAN, N.-A. *et al.* **Mechanism behind the Controlled Generation of Liquid Metal Nanoparticles by Mechanical Agitation.** *ACS Nano*, v. 18, n° 17, p. 11139–11152, 2024. ISSN: 1936-0851, DOI: 10.1021/acsnano.3c12638.

OECD. **Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 71 SILICON DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER.** 2016.

OGAWA, T. *et al.* **Oral intake of silica nanoparticles exacerbates intestinal inflammation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 534, p. 540–546, 2021. ISSN: 0006291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.11.047.

OLIVEIRA, J. DE; GNOATTO, J.; AGUIRRE, T. **NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA (NPSiO₂) UTILIZADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS ASSOCIADOS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).** *Química Nova*, 2023. ISSN: 01004042, DOI: 10.21577/0100-4042.20230015.

PETERS, R. *et al.* **Presence of Nano-Sized Silica during *In Vitro* Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive.** *ACS Nano*, v. 6, nº 3, p. 2441–2451, 2012. ISSN: 1936-0851, DOI: 10.1021/nn204728k.

PFIZER. **Paxlovid® nirmatrelvir e ritonavir.** 2025.

PIECHULEK, A.; BERWANGER, L. C.; MIKECZ, A. VON. **Silica nanoparticles disrupt OPT-2/PEP-2-dependent trafficking of nutrient peptides in the intestinal epithelium.** *Nanotoxicology*, v. 13, nº 8, p. 1133–1148, 2019. ISSN: 1743-5390, DOI: 10.1080/17435390.2019.1643048.

PIMENTEL, B. N. A. da S. *et al.* **Antifungal Activity and Biocompatibility of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ Using a Three-Dimensional Coculture Model of the Oral Mucosa.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, 2022. ISSN: 2296-4185, DOI: 10.3389/fbioe.2022.826123.

PONDMAN, K.; GAC, S. LE; KISHORE, U. **Nanoparticle-induced immune response: Health risk versus treatment opportunity?** *Immunobiology*, v. 228, nº 2, p. 152317, 2023. DOI: 10.1016/j.imbio.2022.152317.

PUSHPARAJ, P. **Revisiting the Micropipetting Techniques in Biomedical Sciences: A Fundamental Prerequisite in Good Laboratory Practice.** *Bioinformation*, v. 16, nº 1, p. 8–12, 2020. ISSN: 09738894, DOI: 10.6026/97320630016008.

RIBEIRO, A. R. *et al.* **Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells.** *Scientific Reports*, v. 6, nº 1, p. 23615, 2016. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep23615.

RIBEIRO, P. C. **Estudo da implicação da interleucina-13 (IL-13) e outros marcadores inflamatórios em trabalhadores expostos à poeira de sílica.** - Fundação Oswaldo Cruz, 2023.

RODRIGUEZ-LOYA, J.; LERMA, M.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. **Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review.** *Micromachines*, v. 15, nº 1, p. 24, 2023. ISSN: 2072-666X, DOI: 10.3390/mi15010024.

SAHANI, S.; SHARMA, Y. C. **Advancements in applications of nanotechnology in global food industry.** *Food Chemistry*, v. 342, p. 128318, 2021. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128318.

SANTOS, A. S. *et al.* **Eosinophils: old cells, new directions.** *Frontiers in Medicine*, v. 11, 2025. ISSN: 2296-858X, DOI: 10.3389/fmed.2024.1470381.

SAPUTRA, O. A. *et al.* **Organically surface engineered mesoporous silica nanoparticles control the release of quercetin by pH stimuli.** *Scientific Reports*, v. 12, nº 1, p. 20661, 2022. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/s41598-022-25095-4.

SHARMA, N.; JHA, S. **Amorphous nanosilica induced toxicity, inflammation and innate immune responses: A critical review.** *Toxicology*, v. 441, p. 152519, 2020. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152519.

SHI, J. H. *et al.* **Nanoparticle Digestion Simulator Reveals pH-Dependent Aggregation in the Gastrointestinal Tract.** *Analytical Chemistry*, v. 92, nº 18, p. 12257–12264, 2020. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01844.

SHUKLA, P.; SHARMA, A.; SHARMA, A. **Food Additives from an Organic Chemistry Perspective.** *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry*, v. 1, nº 3, 2017. DOI: 10.15406/mojboc.2017.01.00015.

SILVA, M. M. N.; PEREIRA, K. S.; ALICE COELHO, M. Z. **Food additives used in non-alcoholic water-based beverages— a review.** DOI: 10.15406/jnhfe.2019.09.00335.

SINGLA, C. *et al.* **Metric-Based Resolvability of Quartz Structure.** *Computers, Materials & Continua*, v. 71, n° 1, p. 2053–2071, 2022. DOI: 10.32604/cmc.2022.022064.

SOHAL, I. S. *et al.* **Ingested engineered nanomaterials: state of science in nanotoxicity testing and future research needs.** *Particle and Fibre Toxicology*, v. 15, n° 1, p. 29, 2018. ISSN: 1743-8977, DOI: 10.1186/s12989-018-0265-1.

SOHAL, I. S. *et al.* **Effects of ingested food-grade titanium dioxide, silicon dioxide, iron (III) oxide and zinc oxide nanoparticles on an in vitro model of intestinal epithelium: Comparison between monoculture vs. a mucus-secreting coculture model.** *NanoImpact*, v. 17, p. 100209, 2020. ISSN: 24520748, DOI: 10.1016/j.impact.2020.100209.

SOUSA DE ALMEIDA, M. *et al.* **The Effect of Substrate Properties on Cellular Behavior and Nanoparticle Uptake in Human Fibroblasts and Epithelial Cells.** *Nanomaterials*, v. 14, n° 4, p. 342, 2024. ISSN: 2079-4991, DOI: 10.3390/nano14040342.

SUMITOMO, S. *et al.* **Comparison of dispersion behavior of agglomerated particles in liquid between ultrasonic irradiation and mechanical stirring.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 40, p. 822–831, 2018. ISSN: 13504177, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.08.023.

TADANO, T. *et al.* **A new mechanism for the silica nanoparticle dispersion–agglomeration transition in a poly(methyl methacrylate)/silica hybrid suspension.** *Polymer Journal*, v. 46, n° 6, p. 342–348, 2014. ISSN: 0032-3896, DOI: 10.1038/pj.2014.6.

TARANTINI, A. *et al.* **Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line.** *Toxicology in Vitro*, v. 29, n° 2, p. 398–407, 2015. ISSN: 08872333, DOI: 10.1016/j.tiv.2014.10.023.

VESCHI, E. A. *et al.* **Validation of Electrical Impedance Technique in Real-Time Using the xCELLigence as an Interference-Free Method for Assessing Cytotoxicity of Silver and Hydroxyapatite Nanoparticles.** *Journal of the Brazilian*

Chemical Society, v. 35, n° 12, 2024. ISSN: 16784790, DOI: 10.21577/0103-5053.20240151.

VIKASH; KUMAR, V. **Ultrasonic-assisted de-agglomeration and power draw characterization of silica nanoparticles.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 65, p. 105061, 2020. ISSN: 13504177, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2020.105061.

VINCENTINI, O. *et al.* **Towards the Standardization of Intestinal In Vitro Advanced Barrier Model for Nanoparticles Uptake and Crossing: The SiO₂ Case Study.** *Cells*, v. 11, n° 21, p. 3357, 2022. ISSN: 2073-4409, DOI: 10.3390/cells11213357.

WANG, J. *et al.* **Gut-Microbiota-Derived Metabolites Maintain Gut and Systemic Immune Homeostasis.** *Cells*, v. 12, n° 5, p. 793, 2023. DOI: 10.3390/cells12050793.

WANG, Y. *et al.* **Ordered nanoporous silica as carriers for improved delivery of water insoluble drugs: a comparative study between three dimensional and two dimensional macroporous silica.** *International Journal of Nanomedicine*, p. 4015, 2013. ISSN: 1178-2013, DOI: 10.2147/IJN.S52605.

WINKLER, H. C.; SUTER, M.; NAEGELI, H. **Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food.** *Journal of Nanobiotechnology*, v. 14, n° 1, p. 44, 2016. ISSN: 1477-3155, DOI: 10.1186/s12951-016-0189-6.

WOŹNIAK, D. *et al.* **The role of microbiota and enteroendocrine cells in maintaining homeostasis in the human digestive tract.** *Advances in Medical Sciences*, v. 66, n° 2, p. 284–292, 2021. DOI: 10.1016/j.advms.2021.05.003.

WU, L. *et al.* **Food additives: From functions to analytical methods.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 62, n° 30, p. 1–21, 2021. DOI: 10.1080/10408398.2021.1929823.

YANG, X. *et al.* **NF- κ B pathway affects silica nanoparticle-induced fibrosis via inhibited inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition in 3D co-culture.** *Toxicology Letters*, v. 383, p. 141–151, 2023. ISSN: 03784274, DOI: 10.1016/j.toxlet.2023.06.014.

YANG, Y. *et al.* **Evaluation of the toxicity of food additive silica nanoparticles on gastrointestinal cells.** *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n° 4, p. 424–435, 2014. ISSN: 0260-437X, DOI: 10.1002/jat.2962.

YAZDIMAMAGHANI, M. *et al.* **Genotoxicity of amorphous silica nanoparticles: Status and prospects.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 16, p. 106–125, 2019. ISSN: 15499634, DOI: 10.1016/j.nano.2018.11.013.

YE, D. *et al.* **Low uptake of silica nanoparticles in Caco-2 intestinal epithelial barriers.** *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 8, p. 1396–1406, 2017. ISSN: 2190-4286, DOI: 10.3762/bjnano.8.141.

YOUNES, M. *et al.* **Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive.** *EFSA Journal*, v. 16, n° 1, 2018. ISSN: 18314732, DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5088.

YU, J. *et al.* **Determination of the fate and biological responses of food additive silica particles in commercial foods.** *Food Chemistry*, v. 331, p. 127304, 2020. ISSN: 03088146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127304.

ZAITER, T. *et al.* **Size effect and mucus role on the intestinal toxicity of the E551 food additive and engineered silica nanoparticles.** *Nanotoxicology*, v. 16, n° 2, p. 165–182, 2022. ISSN: 1743-5390, DOI: 10.1080/17435390.2022.2063084.

ZHANG, S.; WANG, C. **Effect of stirring speed on particle dispersion in silica synthesis.** *Nano-Structures & Nano-Objects*, v. 35, p. 100994, 2023. ISSN: 2352507X, DOI: 10.1016/j.nanoso.2023.100994.

ZHANG, S. Y. *et al.* **Validation of a Caco-2 microfluidic Chip model for predicting intestinal absorption of BCS Class I-IV drugs.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 656, p. 124089, 2024. ISSN: 03785173, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.124089.

ZHOU, H.; MCCLEMENTS, D. J. **Recent Advances in the Gastrointestinal Fate of Organic and Inorganic Nanoparticles in Foods.** *Nanomaterials*, v. 12, n° 7, p. 1099, 2022. DOI: 10.3390/nano12071099.