

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Adny Henrique Silva

**ESTRATÉGIAS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Dra. Tânia Beatriz Creckzynski-Pasa

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586e Silva, Adny Henrique
Estratégias para avaliação da toxicidade de sistemas
nanoestruturados [dissertação] / Adny Henrique Silva ;
orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa. - Florianópolis,
SC, 2011.

136 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Antioxidantes. 3. Nanotecnologia.
4. Nanopartículas. 5. Polímeros. 6. Nanopartículas Metálicas.
I. Pasa, Tania Beatriz Creczynski. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

CDU 615.12

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe Ednéia e meus irmãos João Eugênio e Josinéia, pelo amor incondicional, por ser meu alicerce, minha vida.

À minha orientadora Tânia, minha “mãe científica”, exemplo de conhecimento e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, a quem sou grata pela dádiva da vida, e pelos inúmeros motivos pelos quais agradeço diariamente;

Aos meus pais Quirino e Ednéia, e meus irmãos João Eugênio e Josinéia, pelo carinho, apoio e incentivo, obrigado por vocês existirem e fazerem parte de mais esta conquista;

A minha orientadora e amiga Tânia Beatriz Creckzynski Pasa, por ter me recebido em seu laboratório e ter contribuído para que eu “despertasse” para a ciência. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e pela orientação que resultou neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, pela oportunidade de ter aprendido muito com vocês, pelos momentos de descontração, pelas conversas, e por se tornarem mais que apenas colegas, amigos. A vocês: Evelyn, Andrea, Vânia, Claudriana, Clarissa, Laura, Carine, Fabíola, Daiane, Fabrício, Paula, Tatiane, Jocelane, Maurícia, Jelver, Ivonete, Betina e Bruno, muito obrigado;

A Claudriana, pela realização e auxílio nos experimentos in vivo, pelas conversas, e por ter me recebido tão prontamente em sua casa;

A Laura, amiga, confidente e parceira de laboratório, obrigada pela ajuda nas disciplinas, no inglês, e pela companhia em inúmeros experimentos, muitas vezes à noite e nos finais de semana;

As minhas amigas Carina e Juliana, pela amizade sincera e preocupação constante com minha progressão na pesquisa e meu bem estar pessoal;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou a implementação deste trabalho;

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

“Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz.”

Clarice Lispector

RESUMO

Os termos nanociência e nanotecnologia correspondem à área do conhecimento que manipula a matéria em escala nanométrica e referem-se ao estudo e as aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma das suas dimensões físicas na ordem de alguns nanômetros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de nanopartículas lipídicas (F1, F2, F3, F4, F5, F7 e F8), poliméricas (F9) e metálicas (dióxido de titânio), além do ácido fosfotúngstico (HPW), *in vitro*, em duas linhagens celulares, de fibroblasto de rim de macaco (Vero) e fibroblasto de rim de cachorro (MDCK), e *in vivo*, em camundongos. Através dos ensaios *in vitro* foi possível dizer que as nanopartículas lipídicas e poliméricas estudadas mostraram-se biocompatíveis, uma vez que apenas algumas delas mostraram uma baixa toxicidade, com alto valor de IC₅₀, quando comparadas com a IC₅₀ de outras nanopartículas comumente usadas. Para a nanopartícula de TiO₂, a mesma parece interferir nos métodos de avaliação da toxicidade *in vitro*, sendo que a toxicidade desta nanopartícula pôde ser comprovada através da análise do ciclo celular. Da mesma forma, o HPW demonstrou citotoxicidade nos ensaios de viabilidade *in vitro*, porém ambos, TiO₂ e HPW não demonstraram toxicidade em concentrações abaixo de 100 µg/mL. A avaliação da toxicidade das nanopartículas *in vivo* foi realizada com as nanopartículas F3, F5, F9 e de TiO₂. Foi avaliado o peso dos animais de cada grupo no primeiro e último dia de tratamento, o peso dos órgãos de cada animal após os mesmos serem sacrificados, além de parâmetros hematológicos e bioquímicos, usados comumente como indicativos de toxicidade. Através dos ensaios de toxicidade *in vivo*, as nanopartículas F3 e F9 demonstraram toxicidade renal e hepática, respectivamente, através de parâmetros bioquímicos que são usados para identificar tais alterações. As nanopartículas de TiO₂ causaram alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, que caracterizam dano hepático, além de esplenomegalia.

Palavras chave: toxicidade, nanociência, nanotecnologia, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas

ABSTRACT

The terms nanoscience and nanotechnology correspond to the area of knowledge that the manipulation of matter is at the nanometer scale and refer to the study and technological applications of objects and devices that have at least one dimension in the order of a few nanometers. The aim of this study was to evaluate the toxicity of lipid nanoparticles (F1, F2, F3, F4, F5, F7 and F8), polymeric (F9) and metal (titanium dioxide), and fosfotungstic acid (HPW) *in vitro* in two cell lineages of monkey kidney fibroblasts (Vero) and dog kidney fibroblasts (MDCK), and *in vivo*, in mice. Therefore, by *in vitro* assays, lipid and polymeric nanoparticles studied here showed to be biocompatible, since only some of them showed low toxicity, with small IC₅₀ when compared with other commonly used nanoparticles. The evaluation of TiO₂ nanoparticles cytotoxicity indicated that these metallic nanoparticles interfere in the methods of evaluation of *in vitro* toxicity, and the toxicity of these nanoparticles could be shown by cell cycle analysis. Likewise, the HPW showed cytotoxicity in vitro tests of viability, but both TiO₂ and HPW showed no toxicity at concentrations below 100 µg/mL. The evaluation of the toxicity of nanoparticles *in vivo* was performed with nanoparticles F3, F5, F9 and TiO₂. We evaluated the weight of the mice in the first and in the last day of treatment. After, blood were collected for measurement of hematological and biochemical parameters, commonly used as indicators of toxicity. The animals were posteriorly sacrificed. For tests *in vivo*, the nanoparticles F3 and F9 showed liver and kidney toxicity, respectively, through biochemical parameters that are used to identify these changes. TiO₂ nanoparticles caused changes in hematological and biochemical parameters that characterize liver damage, and splenomegaly.

Keywords: toxicity, nanoscience, nanotechnology, lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, metallic nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Escala manométrica de objetos naturais.	31
Figura 2 – Propriedades físico-químicas das nanopartículas.....	33
Figura 3 - Nanopartículas usadas nas áreas farmacêutica e biomédica.	34
Figura 4 - Diagrama esquemático da modificação de uma nanopartícula e sua absorção pela célula.	36
Figura 5 – Possíveis rotas de exposição a nanopartículas.	38
Figura 6 Esquema representativo do mecanismo geral de fotocatalise	46
Figura 7 Delineamento do estudo de toxicidade <i>in vivo</i>	59
Figura 8 Administração das nanopartículas via intraperitoneal	60
Figura 9 - Citotoxicidade de nanopartículas em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).	64
Figura 10 - Citotoxicidade de nanopartículas em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).	65
Figura 11 - Efeito das nanopartículas na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).....	67
Figura 12 - Efeito das nanopartículas no potencial de membrana mitocondrial em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).	68
Figura 13 - Efeito das nanopartículas sobre a distribuição das células Vero no ciclo celular.	69
Figura 14- Efeito das nanopartículas sobre a distribuição das células MDCK no ciclo celular.	70
Figura 15 – Retirada do sangue através do plexo orbital	73
Figura 16 – Avaliação macroscópica dos órgãos e cavidade abdominal <i>pós-mortem</i>	73
Figura 17 – Micrografia eletrônica de transmissão da nanopartícula de TiO ₂	77
Figura 18 - Citotoxicidade de nanopartículas de TiO ₂ em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B), pelo método do MTT.	79
Figura 19 - Citotoxicidade de nanopartículas de TiO ₂ em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B) pelo método do vermelho neutro.....	80
Figura 20 - Citotoxicidade do HPW em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B), pelo método do MTT.	80
Figura 21 - Citotoxicidade do HPW em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B), pelo método do vermelho neutro.....	81
Figura 22 - Possíveis mecanismos de genotoxicidade induzida por nanopartículas de TiO ₂ em células de epiderme humana.	82

Figura 23 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).	83
Figura 24 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW no potencial de membrana mitocondrial em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).	84
Figura 25 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW na quantidade de DNA x viabilidade, em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B).	85
Figura 26 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW sobre a distribuição das células Vero no ciclo celular.	87
Figura 27 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW sobre a distribuição das células MDCK no ciclo celular.	88
Figura 28 - Acúmulo de nanopartículas de TiO_2 próximo ao fígado e estômago.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Possíveis efeitos fisiopatológicos de nanopartículas	40
Tabela 2 - Caracterização das nanopartículas lipídicas e poliméricas.....	62
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ para os ensaios de viabilidade MTT e vermelho neutro, em 24 h, para as linhagens celulares Vero e MDCK.....	65
Tabela 4 - Variação do peso corpóreo após tratamento com as nanopartículas	72
Tabela 5 - Peso dos órgãos	74
Tabela 6 - Parâmetros hematológicos dos animais controles e tratados.....	75
Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos dos animais controles e tratados.	76
Tabela 8 - Variação do peso corpóreo após tratamento com as nanopartículas	90
Tabela 9 - Peso dos órgãos	92
Tabela 10 - Parâmetros hematológicos dos animais controles e tratados....	93
Tabela 11 - Parâmetros bioquímicos dos animais controles e tratados	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4'-6- diamidino -2- phenylindole
DCFH-DA	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPW	Ácido fosfotúngstico
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
IP	Intraperitonal
JC1	(iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina)
MDCK	Linhagem celular de fibroblasto canino
nm	Nanômetro
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila

PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
POMs	Polioxometalato
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TiO ₂	Dióxido de Titânio
UV	Ultravioleta
Vero	Linhagem celular de fibroblasto de macaco

SUMÁRIO

RESUMO	10
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS	21
1. Introdução	29
2. Referencial Teórico	31
2.1 Nanociência e Nanotecnologia	31
2.2 Aplicações das Nanopartículas	33
2.3 As nanopartículas e o meio ambiente	36
2.4 Toxicidade <i>in vitro</i>	39
2.4.1 Nanopartículas e o estresse oxidativo	41
2.4.2 Metabolismo energético	42
2.4.3 Viabilidade Celular, ciclo celular e nanopartículas	43
2.5 Toxicidade <i>in vivo</i>	44
2.6 Nanopartículas metálicas	45
2.6.1 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO ₂)	45
2.6.2 Nanopartículas Lipídicas	47
2.6.3 Nanopartículas Poliméricas	48
3. Objetivos	49
3.1 Objetivo Geral	49
3.2 Objetivos Específicos	49
3.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	49
3.2.2 Estudos <i>in vivo</i>	49
4. Materiais e Métodos	50
4.1 Reagentes	50
4.2 Preparação e Caracterização das Nanopartículas	50
4.2.1 Nanopartículas Lipídicas	50
4.2.2 Nanopartículas Poliméricas	51
4.2.3 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO ₂)	51
4.2.4 Ácido Fosfotúngstico	52
4.2.5 Caracterização das nanopartículas lipídicas e poliméricas	52
4.3 Estudos <i>in vitro</i>	53
4.3.1 Cultura Celular	53
4.3.2 Tratamento Celular	53
4.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular	53
4.3.3.1 MTT	53
4.3.3.2 Vermelho Neutro	54
4.3.4 Determinação da Curva Concentração x Resposta	55

4.3.5	Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	55
4.3.6	Extração e Quantificação do DNA	56
4.3.7	Potencial de Membrana Mitocondrial	56
4.3.8	Análise do Ciclo Celular	57
4.4	Estudos <i>in vivo</i>	58
4.4.1	Animais	58
4.4.2	Toxicidade <i>in vivo</i> das Nanopartículas	59
4.5	Avaliação Estatística	61
5.	Resultados e Discussão	61
5.1	Nanopartículas Lipídicas e Poliméricas	61
5.1.1	Caracterização das Nanopartículas	61
5.1.2	Avaliação da Toxicidade <i>in vitro</i>	62
5.1.2.1	Ensaio de Citotoxicidade das Nanopartículas	62
5.1.3	Avaliação da Toxicidade <i>in vivo</i>	71
5.2	Nanopartículas de Dióxido de Titânio e (TiO ₂) e Ácido Fosfotúngstico (HPW)	77
5.2.1	Caracterização das Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO ₂)	77
5.2.2	Avaliação da Toxicidade <i>in vitro</i>	78
5.2.2.1	Ensaio de Citotoxicidade das Nanopartículas	79
5.2.2.2	Avaliação da Toxicidade <i>in vivo</i>	90
6.	Conclusões	97
7.	Perspectivas	99
8.	Referências	101
9.	Anexo	115

1. Introdução

A nanociência e a nanotecnologia vem atraindo a atenção de muitos pesquisadores nos últimos anos, principalmente pelo crescente uso de nanopartículas nas mais diversas áreas, entre elas na comunicação, engenharias e medicina. Este interesse advém das características físico-químicas que são exclusivas destes materiais, como tamanho, forma e grande área superficial (LIU 2006; JIN; ZHU; WANG et al. 2008).

As nanopartículas são empregadas na fabricação de diversos produtos de consumo como embalagens (CHEN; MENG; XING et al. 2006), creme dental, cosméticos (MENARD; DROBNE e JEMEC 2011), na medicina, no diagnóstico e terapia do câncer (JOSHI e MÜLLER 2009), além de nanocarreadores de substâncias ativas e na liberação de fármacos e genes (MÜLLER; RUNGE; RAVELLI et al. 2006; YANG; WU; ZHANG et al. 2007; KWON; NAM; NAM et al. 2008), apesar dos mecanismos de interação entre as nanopartículas e os sistemas biológicos ainda serem pouco claros (TSUJI; MAYNARD; HOWARD et al. 2006). Em alguns desses produtos, tais como creme dental e cosméticos, as nanopartículas estão em contato direto com o organismo dos usuários (DAUGHTON e TERNES 1999), e uma falha ou acidente durante a produção dos nanomateriais poderia liberar uma importante quantidade de nanopartículas para o meio ambiente (MOORE 2006).

O desenvolvimento da indústria tecnológica é incentivado pelas propriedades inovadoras das nanopartículas, mas também geram uma grande preocupação em relação à toxicidade destes materiais (STERN e MCNEIL 2008). O tamanho das nanopartículas, propriedade que as torna especiais para diferentes áreas tecnológicas, também pode ser responsável pelo aparecimento de um novo padrão de toxicidade, em que ainda não se tem totalmente esclarecido as reais potencialidades tóxicas, as possíveis formas de exposição, os efeitos para o meio ambiente e para os sistemas biológicos em geral, inclusive dos produtos de degradação destes materiais (CHEN; MENG; XING et al. 2006).

Supõe-se que, devido à pequena dimensão das nanopartículas, estas atravessariam facilmente os tecidos, células e organelas, uma vez que o tamanho destes materiais é semelhante ao de muitas moléculas biológicas, como por exemplo, as proteínas. Fica claro dessa forma a

necessidade de se compreender os mecanismos que determinam o comportamento das nanopartículas, não só para o desenvolvimento desta tecnologia, mas também na tentativa de prever as respostas toxicológicas aos nanomateriais (FADEEL e GARCIA-BENNETT 2010).

Uma vez que os estudos sobre a toxicidade de nanopartículas ainda é insuficiente, toda e qualquer produção científica a esse respeito contribui para a regulamentação do uso e produção destes materiais (BARRENA; CASALS; COLÓN et al. 2009). Sendo assim, a toxicidade de alguns sistemas nanoestruturados como nanopartículas lipídicas, poliméricas e metálicas será avaliada neste trabalho.

2. Referencial Teórico

2.1 Nanociência e Nanotecnologia

Os termos nanociência e nanotecnologia correspondem à área do conhecimento que manipula a matéria em escala nanométrica e referem-se ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma das suas dimensões físicas na ordem de alguns nanômetros (DE MELO e PIMENTA 2004). A palavra nano, derivada do grego “anão”, é usada para designar um bilionésimo de metro e pode ser representado pela notação 10^{-9} m ou pelo símbolo nm (nanômetro) (Fig.1) (ESTEVES; TIMMONS e TRINDADE 2004).

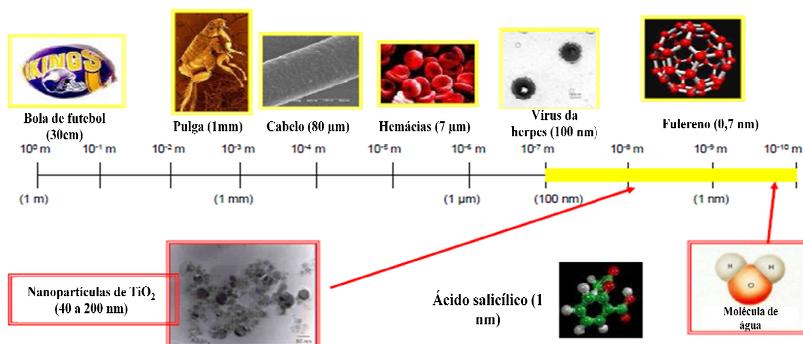


Figura 1 – Escala manométrica de objetos naturais.
Adaptado de (NOHYNEK e DUFOUR 2008).

As nanopartículas, os chamados blocos de construção da nanotecnologia, têm sido amplamente definidas como estruturas com pelo menos 100 nm ou menos. Para aplicações biomédicas, esta definição foi expandida para incluir sistemas nanoestruturados maiores que 100 nm, como por exemplo os lipossomas (STERN e MCNEIL 2008). Neste trabalho será utilizada a denominação nanopartícula também para os lipossomas e nanocápsulas.

Apesar do grande interesse pelo estudo e pela aplicação tecnológica de objetos nanométricos serem bastante recente, a nanotecnologia está presente na natureza a bilhões de anos, desde que as moléculas e átomos começaram a se organizar em estruturas mais complexas que terminaram por dar origem à vida. O homem também

esta envolvido com a nanotecnologia há muito tempo, mesmo que de forma empírica. Por exemplo, sabemos hoje que a tinta nanquim, desenvolvida pelos chineses há mais de dois mil anos, é constituída de nanopartículas de carvão suspensas em uma solução aquosa (DE MELO e PIMENTA 2004).

O primeiro registro de menção ao tema, mesmo que sem o uso do termo Nanotecnologia, se deu em uma palestra realizada em 1959 pelo físico Richard Feynman, intitulada “*There is plenty of room at the bottom*”, ou em português: “Há muito espaço lá em baixo”. Feynman sugeriu escrever 24 volumes da enciclopédia britânica na cabeça de um alfinete e a intenção era mostrar que os átomos poderiam ser manipulados e controlados um a um. O uso do termo atual surgiu apenas em 1976, utilizado por Norio Taniguchi (SOUZA e CAMARA ; INOVAÇÃO 2005).

A nanotecnologia possui um grande número de aplicações nas mais diversas áreas, e está presente na fabricação de centenas de produtos comercialmente disponíveis. A rápida expansão do interesse científico, tecnológico e comercial nos materiais na escala sub-mícron têm ampliado os campos da nanociência e da nanotecnologia. Atualmente, os dados estatísticos mostram que mais de 1000 produtos ou linhas de produtos disponíveis no mercado já utilizam a nanotecnologia em sua produção (JONES e GRAINGER 2009; HSIAO e HUANG 2011). Algumas estimativas realizadas permitem projetar que a nanotecnologia provocará um impacto maior que a Revolução Industrial podendo atingir um trilhão de dólares em 2015, sendo destinado em torno de 18 bilhões de dólares para área de produtos farmacêuticos (NEL; XIA; MÄDLER et al. 2006; JONES e GRAINGER 2009).

As nanopartículas possuem propriedades físico-químicas incomuns, tais como pequeno tamanho, área superficial, composição química, pureza, cristalinidade, propriedades eletrônicas, estrutura de superfície, a reatividade da superfície, solubilidade, forma e agregação (NEL; XIA; MÄDLER et al. 2006). As propriedades que fazem destas estruturas tão atrativas em aplicações industriais e biomédicas são as mesmas propriedades que suscitam preocupações de segurança (Fig. 2) (STERN e MCNEIL 2008). As propriedades físico-químicas não usuais dos sistemas nanoestruturados podem ajudar a entender o poder e o potencial da nanotecnologia. A redução de tamanho, sem a mudança na composição, proporciona aos materiais a aquisição de propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas completamente distintas daquelas do material original. Pode-se considerar uma nova substância,

quando comparada com a forma "não-nano" (ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI-PASA 2008).

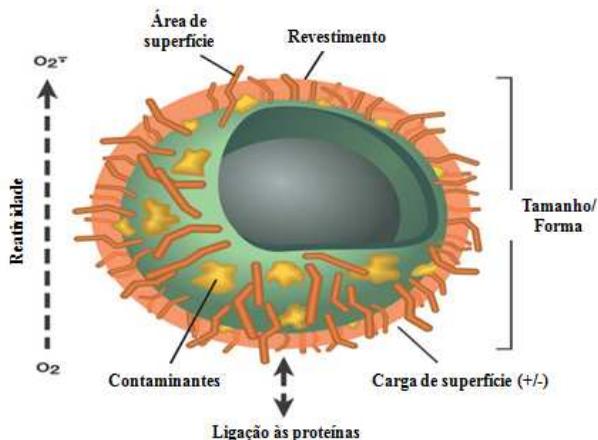


Figura 2 – Propriedades físico-químicas das nanopartículas.
Adaptado de (STERN e MCNEIL 2008).

2.2 Aplicações das nanopartículas

As propriedades físico-químicas das nanopartículas (Fig.3) as tornam extremamente atrativas para o uso nas mais variadas áreas, como na ciência médica, medicamentos, produtos agrícolas (GRASSIAN; O'SHAUGHNESSY; ADAMCAKOVA-DODD et al. 2007) alimentos, cosméticos, microeletrônica, cerâmica e catalisadores. Nos últimos anos, o uso das nanopartículas foi estendido para o diagnóstico e terapia do câncer (JOSHI e MÜLLER 2009), além de nanocarreadores na liberação de fármacos e genes ("Drug Delivery") (MÜLLER; RUNGE; RAVELLI et al. 2006; KWON; NAM; NAM et al. 2008).

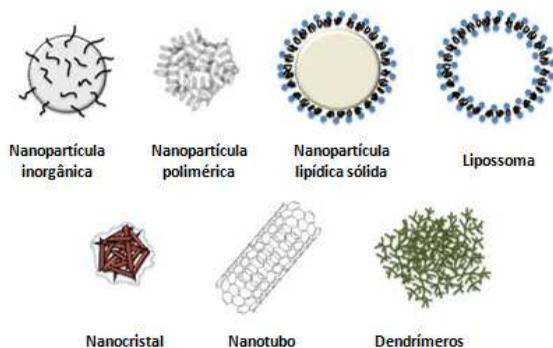


Figura 3 - Nanopartículas usadas nas áreas farmacêutica e biomédica.
Adaptado de (FARAJI e WIPF 2009)

Recentemente, tem-se assistido uma enorme expansão da pesquisa e potenciais aplicações da nanotecnologia na medicina, incluindo a exploração dos nanomateriais na liberação e vetorização de produtos farmacêuticos (BRIGGER; DUBERNET e COUVREUR 2002; FARAJI e WIPF 2009; FADEEL e GARCIA-BENNETT 2010) e aplicações no segmento de imagens médicas (CORMODE; JARZYNA; MULDER et al. 2010). A associação de princípios ativos com conhecida atividade farmacológica a sistemas que permitam a alteração e adequação de suas propriedades físico-químicas sem alterar o seu mecanismo de ação pode ser uma alternativa vantajosa para o tratamento de muitas doenças. O interesse atual em sistemas nanoestruturados reflete a necessidade de liberação do fármaco em áreas específicas do organismo, objetivando aumentar o índice terapêutico. Além desses benefícios, as nanoestruturas também são capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica.

O uso de nanopartículas como sistemas de liberação e vetorização de substâncias ativas possui inúmeras vantagens, como alta estabilidade, alta capacidade de transporte, a capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, e a compatibilidade com diferentes vias de administração (inalação, oral, parenteral, subcutânea).

As nanopartículas também podem ser projetadas para permitir a liberação do fármaco de maneira controlada e em alvos específicos. O uso das nanopartículas como transportadoras de fármacos pode reduzir a toxicidade do princípio ativo incorporado, melhorar a biodisponibilidade da substância ativa, e poderia auxiliar no aumento da adesão ao tratamento da terapia prescrita (BRIGGER; DUBERNET e COUVREUR 2002; ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI-PASA 2008; FADEEL e GARCIA-BENNETT 2010).

As nanopartículas também têm sido amplamente utilizadas em pesquisas biológicas na detecção de biomoléculas em ensaios de DNA, imunoenaios e bioimagem celular (LIU 2006; GARCIA 2010). Normalmente, as nanopartículas são derivatizadas com diferentes grupos funcionais, tais como sondas de oligonucleotídeos ligadas a ácidos nucleicos, anticorpos e proteínas para produzir nanossondas. Ainda, sondas produzidas a partir de nanopartículas de ouro têm sido utilizadas na identificação de bactérias patogênicas em tecnologia de *microarrays* (STORHOFF; MARLA; BAO et al. 2004).

O fato de as nanopartículas possuírem o mesmo tamanho de algumas proteínas torna estes materiais adequados para marcação biológica. Porém, o tamanho é apenas uma das muitas características dessas estruturas e é insuficiente para o uso biológico. Assim, para interagir com o alvo, utiliza-se um revestimento ou camada molecular que irá atuar como interface (SALATA 2004). Revestimentos biológicos podem incluir anticorpos, biopolímeros como o colágeno (SINANI; KOKTYSH; YUN et al. 2003), ou monocamadas de pequenas moléculas que compõem as nanopartículas biocompatíveis (ZHANG; KOHLER e ZHANG 2002). A abordagem utilizada na construção de nanobiomateriais é exemplificada na Figura 4.

Atualmente, existe um grande foco na aplicação da nanotecnologia no tratamento do câncer. A nanotecnologia é um novo campo interdisciplinar que, envolve biologia, física, química, engenharia, farmácia e medicina com o objetivo de levar os principais avanços no diagnóstico, tratamento e detecção do câncer (FERRARI 2005). Diferentes sistemas nanoestruturados têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do câncer, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas), nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, assim como os conjugados.

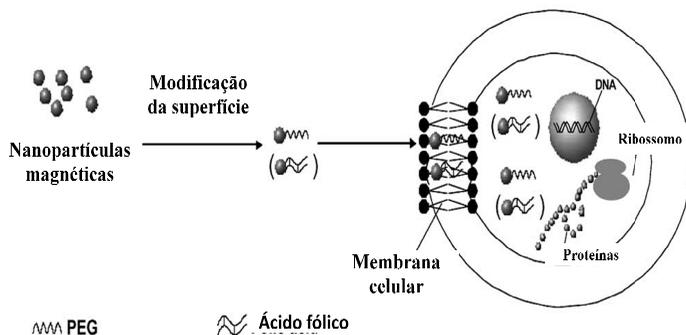


Figura 4 - Diagrama esquemático da modificação de uma nanopartícula e sua absorção pela célula. Adaptado de (ZHANG; KOHLER e ZHANG 2002)

Os primeiros sistemas nanoestruturados utilizados como carreadores na quimioterapia para o câncer foram os lipossomas. Lipossomas são geralmente de tamanho nanométrico e consistem em uma bicamada lipídica em torno de um núcleo aquoso. Os primeiros estudos para relatar a eficiência dos lipossomas como carreadores foram no sentido de melhorar a farmacocinética e biodistribuição do fármaco doxorubicina, que possui conhecida atividade quimioterápica, mas com atividade cardiocitotóxica importante e portanto, uso limitado (WANG e THANOU 2010). Um exemplo de sucesso dessa utilização é o medicamento Doxil®, doxorubicina lipossomal peguilada, que demonstrou alta eficiência, devido à melhoria da farmacocinética (ALLEN e MARTIN 2004). Atualmente, existem mais de 70 ensaios clínicos em curso utilizando nanopartículas para o câncer (<http://clinicaltrials.gov>; pesquisa dos termos nanopartículas e câncer em maio/2011).

2.3 As nanopartículas e o meio ambiente

O efeito da utilização de produto de natureza nanotecnológica dentro da perspectiva da saúde pública e do meio ambiente é pouco monitorado e nenhum governo desenvolveu, até o momento, uma regulamentação específica para tratar produtos em escala nanométrica ou para os impactos sociais e ambientais desta nova tecnologia. Apesar da ampla gama de aplicações, ainda faltam informações sobre o impacto

das nanopartículas na saúde humana e ao meio ambiente (BRAYDICH-STOLLE; HUSSAIN; SCHLAGER et al. 2005).

Com o rápido crescimento de suas novas aplicações, as nanopartículas são produzidas no mundo em grandes quantidades e como consequência, a exposição humana a esses materiais é inevitável e vem aumentando rapidamente. A falta de dados sobre a toxicidade de nanomateriais torna difícil determinar se existe um risco associado à exposição a estas substâncias. Assim, há uma necessidade urgente de desenvolver metodologias que determinem essa toxicidade de forma rápida, precisa e eficiente, com o intuito de avaliar o potencial efeito tóxico destes materiais emergentes (HU; COOK; WANG et al. 2009). A toxicologia dos nanomateriais tornou-se uma nova fronteira em toxicologia das partículas. No entanto, nosso conhecimento atual sobre os potenciais efeitos adversos das nanopartículas ainda é muito limitado (STERN e MCNEIL 2008).

A liberação de nanopartículas para o meio ambiente pode acontecer durante a fabricação de produtos, através de acidentes de trabalho durante a produção, ou mesmo como resíduos. O uso de produtos contendo nanopartículas na formulação pode levar a exposição destas através da pele, ao usar cosméticos como cremes e protetores solares contendo nanopartículas, ou mesmo ao ingerir alimentos que contenham estas substâncias nas preparações ou nas embalagens. A exposição também pode ocorrer em aplicações terapêuticas e diagnósticas. As rotas de exposição de uma nanopartícula podem variar durante o seu ciclo de vida (Fig 5) (TSUJI; MAYNARD; HOWARD et al. 2006).

Basicamente, a avaliação do risco de exposição às nanopartículas envolve uma estimativa do potencial de exposição e caracterização do perigo. As potenciais zonas de exposição incluem a inalação, absorção dérmica e oral, e no caso de aplicações biomédicas, parenteral (STERN e MCNEIL 2008). A toxicidade resultante da exposição às nanopartículas poderia ocorrer em diversos órgãos, como nos pulmões, na pele ou em órgãos distantes. Para a predição de toxicidade sistêmica após exposição não parenteral, a dose sistêmica é um importante parâmetro. Estudos abordando a translocação sistêmica de nanopartículas de locais de deposição estão começando a desvendar a dinâmica da interação organismo-nanopartículas, e fornecer os meios para relacionar a exposição com os possíveis riscos (Elder e Oberdorster, 2006).

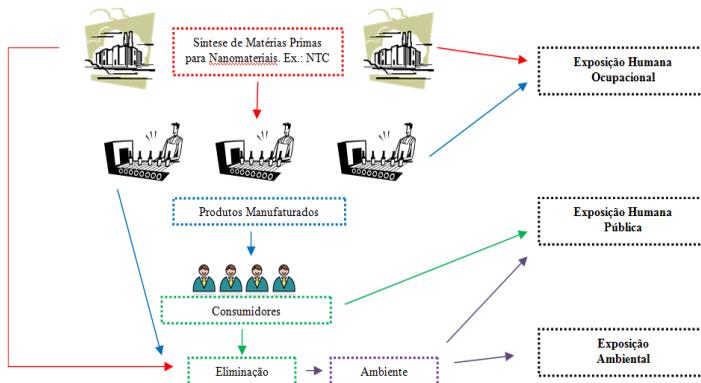


Figura 5 – Possíveis rotas de exposição à nanopartículas.
Adaptado de (TSUJI; MAYNARD; HOWARD et al. 2006).

A discussão sobre nanotoxicologia tem ganhado espaço na comunidade científica, como uma resposta a uma necessidade de mais informações, especialmente com relação a segurança. Apesar dos 172.599 artigos publicados até maio de 2011 apresentando os temas nanotecnologia, nanomateriais ou nanopartículas, apenas 22.381 destes tratava-se de artigos sobre toxicidade ou toxicologia (<http://www.sciencedirect.com/>; pesquisa dos termos citados acima, em maio/2011). O desconhecimento sobre a nanotoxicologia tem dificultado a criação de leis específicas para ordenar a produção, distribuição e descarte de produtos que contenham materiais nanoestruturados (ZANETTI-RAMOS e CRECZYNSKI-PASA 2008; PASCHOALINO; MARCONE e JARDIM 2010).

A implementação de um processo sistemático para identificar o impacto das nanopartículas sobre a saúde ambiental tornou-se um problema para as indústrias e os órgãos reguladores do governo. Portanto, o desenvolvimento comercial e utilização de nanomateriais apresentará novos desafios para empresas e governos em garantir a segurança dos produtos para os trabalhadores e, finalmente, para os consumidores.

2.4 Toxicidade *in vitro*

A avaliação da toxicidade de nanopartículas é feita por meio de estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Os estudos de toxicidade *in vitro* são realizados, inicialmente, para estabelecer o direcionamento dos testes de toxicidade *in vivo*, porém, em relação às nanopartículas, esses testes estão sendo realizados concomitantemente por diversos pesquisadores. A cultura de células é, portanto, uma alternativa para prever a toxicidade sistemática das nanopartículas *in vitro*, com a utilização de diversas linhagens de células, cada qual com características próprias.

Para classificar o principal problema abordado neste trabalho, apresentam-se resumidos na Tabela 1 os possíveis efeitos deletérios causados por materiais nanoestruturados e os respectivos efeitos fisiopatológicos, baseados em evidências experimentais e clínicas. Baseado nestas evidências observa-se claramente a necessidade de atuação na caracterização da toxicidade de materiais nanoestruturados desenhados e preparados para diferentes fins. Muitos trabalhos vem sendo desenvolvidos neste sentido, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Park e colaboradores (2008), avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) utilizando culturas de células do epitélio pulmonar BEAS-2B. A viabilidade das células foi reduzida para 40% em relação ao grupo controle, com apenas 40 µg/mL das nanopartículas. Os autores ainda confirmaram ativação de proteases relacionadas com a apoptose (caspase-3) e aumento do estresse oxidativo, correlacionando estes parâmetros com a citotoxicidade (PARK; YI; CHUNG et al. 2008).

Em estudo mais recente, foram avaliadas a cito e a genotoxicidade causada por nanopartículas de TiO₂ em culturas de fibroblastos murino NIH 3T3 e humanos HFW, em que foram demonstradas alterações no ciclo celular com bloqueio da fase G2/M, e alteração da segregação cromossômica, duplicação do centrossoma e citocinese (HUANG; CHUEH; LIN et al. 2009). Com relação ao estresse oxidativo, Teodoro e colaboradores (2011) demonstraram o comprometimento da capacidade de fosforilação oxidativa da célula, assim como a perda do potencial de membrana mitocondrial ao incubar nanopartículas de prata de diferentes tamanhos com mitocôndrias extraídas de fígado de ratos (TEODORO; SIMÕES; DUARTE et al. 2011).

Tabela 1 – Possíveis efeitos fisiopatológicos de nanopartículas.

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS	POSSÍVEIS EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS
Geração de espécies reativas de oxigênio	Danos em proteínas, DNA e membranas (estresse oxidativo)
Estresse oxidativo	Inflamação e distúrbio mitocondrial
Distúrbio mitocondrial	Danos na membrana interna, mudanças na permeabilidade
Inflamação	Infiltração de células inflamatórias nos tecidos, fibrose, granulomas, aterogênese, fase aguda de expressão de proteínas,
Captura pelo sistema retículo endotelial	Capturas assintomáticas e estocagem em fígado, baço e linfonodos; possibilidade de aumento de órgão e disfunção
Desnaturação e degradação de proteínas	Perda de atividade enzimática e auto-antigenicidade
Captura pelo núcleo	Danos em DNA, agregação de proteínas nucleares, auto-antígenos
Captura pelo tecido neuronal	Danos cerebrais e do sistema nervoso periférico
Distúrbio na função dos fagócitos	Inflamação crônica, fibrose, granulomas, interferência na eliminação de agentes infecciosos
Disfunção no sistema endotelial	Aterogênese, trombose, ataque do coração
Geração de neoantígenos	Autoimunidade
Alterações na regulação do ciclo celular	Proliferação celular
Danos ao DNA	Mutagênese, metaplasia, carcinogênese

Fonte: adaptado de (NEL; XIA; MÄDLER et al. 2006).

Ainda utilizando estruturas metálicas, nanopartículas de ouro ao serem incubadas com células de adenocarcinoma alveolar humano A549, resultou em significativa alteração na morfologia nuclear, observadas após coloração com DAPI, uma sonda nuclear fluorescente. A condensação nuclear é considerada um importante marcador de citotoxicidade (PATRA; BANERJEE; CHAUDHURI et al. 2007).

Porém, em muitos casos, a toxicidade associada com nanopartículas têm sido atribuída a agentes contaminantes que adsorvem à superfície da partícula durante o processo de produção ou transporte, e não ao nanomaterial em si. Em estudo realizado em 2003, foi demonstrada a geração de estresse oxidativo em macrófagos tratados com partículas em nanoescala coletadas no ar de uma grande cidade dos Estados Unidos, e correlacionaram esta toxicidade com o teor de contaminantes orgânicos das nanopartículas (LI; SIOUTAS; CHO et al. 2003). Um estudo posterior concluiu que quinonas e hidrocarbonetos poliaromáticos contaminantes foram responsáveis pela disfunção mitocondrial observada em macrófagos RAW 264.7, tratados com nanopartículas presentes em escape acidental de diesel, coletado em automóvel no Japão (XIA; KORGE; WEISS et al. 2004). Estes dados apenas reforçam a necessidade de uma eficiente caracterização no processo de produção destas nanopartículas, assim como na avaliação da toxicidade.

2.4.1 Nanopartículas e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNs) e o sistema de defesa antioxidante endógeno, podendo levar a uma série de mudanças fisiológicas, geradas por danos importantes em biomoléculas, com potencial impacto sobre todo o organismo (AHAMED 2011). As EROS são moléculas instáveis e altamente reativas (SIES 1997). A produção de EROs acontece fisiologicamente durante a respiração celular mitocondrial, além de serem também geradas pela radiação ultravioleta, raios x e raios gama. São produtos de reações catalisadas por metais, estão presentes em forma de poluentes na biosfera e em organismos vivos superiores são produzidos por neutrófilos e macrófagos nos processos inflamatórios. As EROS podem ser consideradas malélicas por causarem danos aos lipídios de membrana (lipoperoxidação), ao DNA, às proteínas, e por promoverem apoptose e necrose mesmo em células saudáveis. Entretanto, em condições

de equilíbrio redox, as EROs possuem atividade benéfica por participarem na defesa contra agentes infecciosos e na sinalização celular (VALKO; RHODES; MONCOL et al. 2006).

Um dos mecanismos moleculares propostos para toxicidade induzida por nanopartículas é a geração de EROs. Um mecanismo frequentemente discutido é a indução de danos oxidativos dos constituintes celulares, quer devido à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) ou pela inativação do sistema de defesa antioxidante (NEL; XIA; MÁDLER et al. 2006; STONE e DONALDSON 2006). O estresse oxidativo tem sido proposto como um mecanismo comum de lesão celular induzida por vários tipos de nanopartículas, como demonstrado por diversos autores (PARK; YI; CHUNG et al. 2008; WANG; GAO; LAN et al. 2009; AHAMED 2011; SHUKLA; SHARMA; PANDEY et al. 2011), podendo levar a morte celular em diferentes linhagens (PARK; YI; CHUNG et al. 2008; EOM e CHOI 2009; HUSSAIN; BOLAND; BAEZA-SQUIBAN et al. 2009; KIM; CHOI; CHOI et al. 2009).

2.4.2 Metabolismo energético

A mitocôndria é apontada em inúmeros estudos como o principal mediador da morte por apoptose. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes. O colapso do potencial de membrana mitocondrial se dá quando sinais de morte alcançam a mitocôndria. Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma. A perda do potencial de membrana, além de provocar a liberação de moléculas pela mitocôndria, também levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de EROS. O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do potencial de membrana. A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose (BERNARDI 1999; GRIVICICH; REGNER e ROCHA 2007).

O metabolismo energético pode ser um alvo de toxicidade relacionado com nanopartículas. A principal preocupação com relação à interação das nanopartículas com as células é o fato de que alguns nanomateriais são transportados através das membranas celulares,

especialmente em mitocôndrias (FOLEY; CROWLEY; SMAIHI et al. 2002). No entanto, não está totalmente esclarecido se as nanopartículas entram diretamente na mitocôndria ou são internalizadas como consequência do dano oxidativo (LI; SIOUTAS; CHO et al. 2003). A perda do potencial mitocondrial induzido pelas nanopartículas tem importantes efeitos biológicos, especialmente na diminuição da produção de ATP e no início da apoptose (HIURA; LI; KAPLAN et al. 2000; TEODORO; SIMÕES; DUARTE et al. 2011).

2.4.3 Viabilidade celular, ciclo celular e nanopartículas

A divisão celular consiste de dois processos consecutivos caracterizados principalmente pela replicação do DNA e a segregação dos cromossomos replicados em duas células. Originalmente, a divisão celular foi dividida em duas etapas: a mitose (M), ou seja, o processo de divisão nuclear e a intérfase, o intervalo entre duas fases M. As fases da mitose incluem prófase, anáfase, metáfase e telófase. Sob o microscópio, as células da intérfase simplesmente crescem em tamanho, mas diferentes técnicas revelaram que a intérfase inclui as fases G1, S e G2 (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN 2003). A síntese de DNA e mitose ocorrem durante a fase S e a fase M, respectivamente. Estes acontecimentos marcantes são separados pelas fases G1 e G2 durante os quais mRNAs e proteínas acumulam continuamente (MADDIKA; ANDE; PANIGRAHI et al. 2007). Na fase G1 a célula prepara-se para a síntese de DNA, cresce e apresenta $2n$ de cromossomos. Na fase subsequente S, ocorre a duplicação do DNA chegando a $4n$ no final da fase. Antes das células sofrerem mitose, elas continuam na fase G2 com crescimento celular e são, portanto, preparadas para a divisão celular. Durante a mitose, ocorre a separação em duas células-filha. Células que estão na fase G0 são chamadas de quiescentes e permanecem indefinidamente sem se dividir (COLLINS e GARRETT 2005).

Quando uma célula sofre um dano, o ciclo celular é bloqueado (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN 2003). A célula interrompe o processo de divisão para que toda a maquinaria de reparo do DNA – proteínas específicas capazes de corrigir variados danos celulares – seja acionada para dar oportunidade de reparar o dano e posteriormente, poder dar continuidade ao ciclo. Por outro lado, quando este dano for grande o suficiente para não ser reparado, a eliminação da célula danificada é inevitável. Dessa forma, a análise do ciclo celular

permite avaliar o conteúdo de DNA de cada célula, podendo ser utilizado para estimar a distribuição celular no ciclo celular, bem como a sua regulação, sendo assim uma ferramenta para compreensão dos efeitos das nanopartículas nas células (TAVARES e TAVARES 2009; WANG; GAO; LAN et al. 2009; WU; SUN e XUE 2010).

2.5 Toxicidade *in vivo*

Os ensaios de toxicidade *in vivo* são demorados, caros e envolvem questões éticas com o uso de animais. Por conta disso, os testes de toxicidade *in vitro* tem sido a primeira escolha para a maioria dos pesquisadores que trabalham com nanomateriais. Isso pode ser atribuído ao fato de que os ensaios *in vitro* além de serem mais rápidos, convenientes e menos dispendiosos, são desprovidos de quaisquer questões éticas. No entanto, a complexa interação célula-matriz, a interação célula-célula, a diversidade de tipos de células, e os efeitos hormonais presentes *in vivo* não são encontradas em culturas celulares. Além disso, estudar o efeito crônico de uma substância também não é possível sem os experimentos *in vivo* (DHAWAN e SHARMA 2010).

Como já mencionado, o uso de nanopartículas na área biomédica tem crescido muito nos últimos anos, levando ao surgimento de um novo campo de diagnóstico e tratamento. Muitas dessas aplicações envolvem a administração ou implantação de nanopartículas em sistemas biológicos. Para a efetiva utilização das nanopartículas em tratamento e distribuição de medicamentos, é possível iniciar esta avaliação através da análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, além de alterações histopatológicas dos animais tratados com estas estruturas (LASAGNA-REEVES; GONZALEZ-ROMERO; BARRIA et al. 2010).

Alguns parâmetros hematológicos são frequentemente utilizados como marcadores para avaliar a função hepática e renal (ZHANG; NIU; LI et al. 2010). Geralmente, danos às células do fígado são caracterizados por um aumento na concentração plasmática de enzimas como a aspartato transaminase (AST) e a alanina transaminase (ALT). A AST aparece em altas concentrações em vários tecidos como fígado, rins, coração e pâncreas, porém, a ALT é liberada principalmente dos hepatócitos para o sangue em situações de dano celular, sendo considerado um bom marcador de dano hepatocelular. As proteínas totais, representadas principalmente pela albumina podem estar aumentadas na presença de lesões hepáticas (PATRA; ABDEL

MONEIM; WANG et al. 2009). A toxicidade renal pode ser determinada por meio dos níveis de uréia e creatinina no sangue, que são metabólitos associados com a funcionalidade dos rins (LASAGNA-REEVES; GONZALEZ-ROMERO; BARRIA et al. 2010).

2.6 Nanopartícula metálicas

2.6.1 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO₂)

O dióxido de titânio (TiO₂), um pó branco e inodoro, existe naturalmente na forma de anatase, rutilo e brookita. É capaz de absorver e refletir a luz e é frequentemente usado como pigmento branco em uma vasta gama de produtos como tintas, papel, plástico, cerâmica, protetor solar e cosméticos (WANG; ZHOU; CHEN et al. 2007; LIU; YIN; PU et al. 2009), além de aditivos farmacêuticos e alimentares como pasta de dente, cápsulas e pastilhas (WANG; ZHOU; CHEN et al. 2007; JIN; ZHU; WANG et al. 2008; LIU; YIN; PU et al. 2009). Atualmente, é produzido em abundância e amplamente utilizado devido à sua alta estabilidade, além do uso como filme protetor contra corrosão (WANG; ZHOU; CHEN et al. 2007) e como fotocatalisador (WANG; ZHOU; CHEN et al. 2007; LIU; LIU; LIU et al. 2010; GHALY; JAMIL; EL-SEESY et al. 2011).

A utilização do TiO₂ tem expandido-se nos últimos anos especialmente como fotocatalisador, em um processo chamado fotocátalise heterogênea. Trata-se de um processo com potencial aplicação na descontaminação de poluentes tóxicos e não biodegradáveis, comumente presentes no ar, efluentes domésticos e industriais (NOGUEIRA e JARDIM 1998; OLLIS 2000). O princípio da fotocátalise heterogênea consiste na ativação de um semicondutor, por exemplo o TiO₂, através da luz solar ou artificial, formando um radical [•]OH altamente oxidante. Este radical é capaz de reagir com uma grande variedade de classes de compostos, oxidando o contaminante orgânico e promovendo a total mineralização destes compostos para substâncias inócuas como CO₂ e água (NOGUEIRA e JARDIM 1998; VALENTE; PADILHA e FLORENTINO 2006; GHALY; JAMIL; EL-SEESY et al. 2011).

Um semicondutor é caracterizado por bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC), sendo a região entre elas chamada de

“bandgap”. A irradiação UV do TiO_2 com energia superior ou igual a energia de “bandgap”, resulta na promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução, gerando uma lacuna (h^+) na banda de valência (Fig.6). A competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semiconductor e o processo de recombinação do par elétron/lacuna, resultando na liberação de calor é que determinará a eficiência da fotocatalise (NOGUEIRA e JARDIM 1998; GHALY; JAMIL; EL-SEESY et al. 2011).

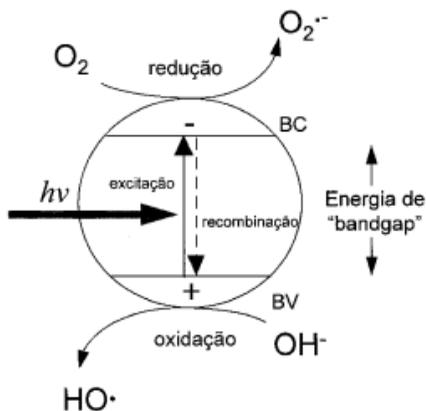


Figura 6 Esquema representativo do mecanismo geral de fotocatalise.

Fonte: (NOGUEIRA e JARDIM 1998).

Alguns semicondutores como o sulfeto de cádmio (CdS), o óxido de estanho (SnO_2) e o óxido de ferro (Fe_2O_3) são comumente utilizados como catalisadores (NOGUEIRA e JARDIM 1998). No entanto o TiO_2 apresenta características de semiconductor além de melhor desempenho e maior rendimento fotocatalítico no processo de fotocatalise heterogênea que outros materiais (GOGATE e PANDIT 2004). Apesar disso, a recombinação elétron/lacuna é o principal limitante para o rendimento total do processo de fotocatalise. A incorporação de metais à estrutura cristalina ou à superfície do TiO_2 tem sido estudada com o intuito de minimizar tal recombinação (NOGUEIRA e JARDIM 1998). Assim, em parceria com um grupo de pesquisa do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, a toxicidade de nanopartículas de TiO_2 com ácido fosfotúngstico

(HPW) adsorvido será estudada, com o intuito de aumentar a atividade fotocatalítica do TiO_2 . Iniciamos os ensaios avaliando a toxicidade das nanopartículas de TiO_2 e do HPW, separadamente, para então na sequência, ser estudada a toxicidade do TiO_2 com o HPW adsorvido. As nanopartículas de TiO_2 com HPW adsorvido já foram sintetizadas, mas devido a instabilidade das nanopartículas em pH ideal de crescimento para as células, os ensaios de toxicidade com estes materiais serão realizados em outra oportunidade.

2.6.2 Nanopartículas Lipídicas

Nanopartículas lipídicas sólidas são partículas compostas de matriz lipídica sólida, biocompatível e biodegradável (JOSHI e MÜLLER 2009), também chamadas de lipoesferas ou nanoesferas lipídicas sólidas, e apresentam um tamanho entre 50 e 1000 nm. São preparadas usando uma grande variedade de ácidos lipídicos, mono-, di- ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos ou ceras, que são estabilizados por tensoativos biocompatíveis aniônicos, catiônicos ou não iônicos (WONG; BENDAYAN; RAUTH et al. 2007).

As nanopartículas lipídicas tem sido amplamente utilizadas na nanomedicina, como por exemplo, em formulações cosméticas e de pele (PARDEIKE; HOMMOSS e MÜLLER 2009), em formulações usadas no tratamento do câncer (CHATTOPADHYAY; SHEKUNOV; YIM et al. 2007; JOSHI e MÜLLER 2009; WANG e THANOU 2010), na administração de medicamentos via oral e ocular (MÜLLER; RUNGE; RAVELLI et al. 2006), na terapia gênica (KWON; NAM; NAM et al. 2008) na geração de imagens, entre outros. Apesar de muitas nanopartículas lipídicas não demonstrarem citotoxicidade em trabalhos anteriores (MÜLLER; RUNGE; RAVELLI et al. 2006; LIU; GONG; FU et al. 2008; JOSHI e MÜLLER 2009; YUAN; ZHANG; DU et al. 2010), a composição das nanopartículas utilizadas nos experimentos não é uniforme e variam quanto a natureza e porcentagem de lipídios. Devido à fraca comparabilidade dos dados de toxicidade na literatura, é necessário estudar a toxicidade das nanopartículas lipídicas primeiramente *in vitro*, em seguida, *ex vivo* e, finalmente, *in vivo* (NASSIMI; SCHLEH; LAUENSTEIN et al. 2010).

2.6.3 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais sólidos de natureza polimérica, cujo tamanho oscila entre 10 e 1000 nm, que podem apresentar-se como sistemas matriciais homogêneos constituídos por uma rede polimérica (nanoesferas), ou como estruturas vesiculares heterogêneas em que o fármaco encontra-se confinado numa cavidade envolvida por uma membrana polimérica (nanocápsulas). A maioria das nanopartículas poliméricas são biodegradáveis e biocompatíveis, e tem sido adotadas como as nanopartículas preferidas na liberação ou veiculação de fármacos. Elas também apresentam um bom potencial de modificação de superfície através de transformações químicas, oferecem excelente controle farmacocinético, e são adequadas para incorporação e liberação de uma ampla gama de agentes terapêuticos. São formuladas a partir de gelatinas, quitosana, copolímero poli (ácido láctico-co-glicólico), ácido polilático, ácido poliglicólico, poli (metilmetacrilato) e poli (butil) cianoacrilato. Além disso, os revestimentos à base de polímero podem ser funcionalizados com outros tipos de nanopartículas para mudar e melhorar as propriedades de sua biodistribuição. Um exemplo de polímero biologicamente inerte é o PEG - poli (etilenoglicol), que tem sido amplamente usado ligado à superfície de nanopartículas (FARAJI e WIPF 2009). O tamanho reduzido das nanopartículas e nanocápsulas as habilita a atravessar barreiras biológicas, aumentando a tolerância tissular, a captura e o transporte celular, tornando-as eficientes para a liberação de fármacos em alvos específicos.

Diante do exposto, procuramos utilizar neste trabalho a experiência que o nosso grupo vem adquirindo com estudos de toxicidade provocados por novas moléculas antitumorais isoladas ou reconstituídas em sistemas nanoestruturados, e foi implementado um estudo de toxicidade *in vitro* e *in vivo* de sistemas nanoestruturados com potencial utilização nas áreas farmacêutica, biomédica e na fotocatálise heterogênea.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de nanopartículas lipídicas, poliméricas e metálicas *in vitro*, em duas linhagens celulares, de fibroblasto de rim de macaco (Vero) e fibroblasto de rim de cachorro (MDCK), e *in vivo*, em camundongos;

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudos *in vitro*

Avaliar o efeito citotóxico de nanopartículas lipídicas, polimérica e metálica, em linhagens celulares Vero e MDCK, através de dois ensaios de viabilidade celular;

Avaliar através de curva concentração-resposta a concentração de nanopartículas citotóxicas capaz de inibir 50% do crescimento celular;

Avaliar o estresse oxidativo por meio da determinação das EROs nas células tratadas com as nanopartículas;

Avaliar o potencial de membrana mitocondrial das células após incubação com as nanopartículas;

Avaliar a capacidade das nanopartículas de interferir no ciclo celular;

3.2.2 Estudos *in vivo*

Avaliar a toxicidade das nanopartículas lipídicas, poliméricas e metálicas *in vivo*, em camundongos, através de parâmetros bioquímicos e hematológicos;

4. Materiais e Métodos

4.1 Reagentes

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultiab (São Paulo, Brasil); a penicilina e a estreptomicina foram adquiridas da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfóxido (DMSO) e o álcool etílico foram adquiridos da Nuclear; o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl), o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e o carbonato de sódio (Na₂CO₃), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); o 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1) foi adquirido da Invitrogen® (Alemanha); a RNase foi adquirida da Promega (Wincosin, Madison, EUA); o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), o ácido N-[2-Hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a albumina bovina, a acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o triton-X100, o carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) e o neutral red foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, EUA), kits de reagentes Labtest® (Lagoa Santa, MG)

4.2 Preparação e Caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas lipídicas (F1, F2, F3, F4, F5, F7 e F8) e poliméricas (F9) foram sintetizadas pela Dr^a. Betina Giehl Zanetti-Ramos, da Nanovetores – Encapsulados de Alta Tecnologia, e as nanopartículas de TiO₂ e o HPW foram preparados pelo professor Ubirajara Ferreira, do Instituto de Química de São Carlos, ambos colaboradores deste projeto.

4.2.1 Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas de triestearina ou de vaselina sólida branca (USP) foram preparadas por solubilização de 200 mg de lipídios em

uma solução de metanol/clorofórmio (1:1). Os solventes orgânicos foram removidos e os lipídios foram fundidos 5 °C acima do seu ponto de fusão. A fase aquosa foi preparada pela dissolução de Tween 80 ou SDS (dodecil sulfato de sódio) (1%) em água ultra-pura (MilliQ - Millipore®) (qsp 20 mL) aquecida na mesma temperatura de fusão dos lipídios. A fase aquosa foi adicionada à fase lipídica e submetida à irradiação ultra sônica (Vibracells) por 2 minutos, a 20 W de potência. As partículas foram obtidas após o resfriamento da formulação a temperatura ambiente. Partículas preparadas com lipídios vegetais são patenteadas e produzidas pela Nanovetores® - PI 0801545-7A2. Técnica semelhante à descrita acima foi utilizada na preparação destas nanopartículas, excluindo-se o uso de solventes orgânicos.

4.2.2 Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pela Dra. Betina Giehl Zanetti-Ramos, conforme descrito em (ZANETTI-RAMOS; LEMOS-SENNA; SOLDI et al. 2006). Uma mistura de monômeros (10 g) contendo o diisocianato e um polioliol natural em uma razão molar $[NCO]/[OH]= 1.1$ e 3% de óleo de oliva como agente hidrofóbico foi adicionado à temperatura ambiente e sob agitação em água ultra-pura (Milli Q – Millipore®), juntamente com o tensoativo Tween 80, na concentração de 2% (p/p). As nanopartículas de poliuretano foram obtidas com o uso de um homogeneizador (Ultra-Turrax T18, IKA, Alemanha) a 18.000 rpm, por 15 min. As dispersões foram mantidas sob agitação mecânica (800 rpm) a 60 °C por 4 h, para permitir a formação completa do poliuretano.

4.2.3 Nanopartículas de TiO₂

Por se tratar de uma nanopartícula adquirida comercialmente da Sigma Aldrich, dados como composição e tamanho das nanopartículas fazem parte do laudo de análise do fornecedor. A caracterização da nanopartícula foi realizada também por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão, pelo prof. Dr. Ubirajara Ferreira, do Instituto de Química de São Carlos, em cooperação com o Prof. André Avelino Pasa e o Dr. José Javier Acunã, da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2.4 Ácido fosfotúngstico

O ácido fosfotúngstico (HPW – Sigma Aldrich®) utilizado neste trabalho encontrava-se na forma de pó branco, e para utilização do mesmo nos experimentos foi feita uma diluição em água destilada (100 mg/mL). A solução estoque foi mantida sob refrigeração até o momento da utilização nos ensaios.

4.2.5 Caracterização das nanopartículas lipídicas e poliméricas

O tamanho médio de partículas (e sua distribuição) e potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), equipado com ângulo de espalhamento de 173 °. As medições foram feitas a 25 °C após diluição adequada de amostras em água destilada. A distribuição de tamanho de partículas é dada pelo índice de polidispersidade (PDI ou PI). Para medir o potencial zeta, amostras de nanopartículas foram colocadas em uma célula específica quando um potencial de $\pm 150\text{mV}$ foi estabelecido. Os valores de potenciais foram calculados a partir dos valores da média de mobilidade eletroforética, através da equação de Smoluchowski. Na tabela 2 estão apresentados os dados referentes a preparação e caracterização das nanopartículas lipídicas e poliméricas.

4.3 Estudos *in vitro*

4.3.1 Cultura Celular

As duas linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). Trata-se da linhagem Vero (fibroblasto de macaco) e da linhagem MDCK (fibroblasto de cão). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (GRTB 1990; BOREK 1995) e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

4.3.2 Tratamento Celular

As nanopartículas utilizadas em cada ensaio foram mantidas em banho de 37°C por 30 minutos antes da utilização. As células foram incubadas com as nanopartículas em placas de 6, 12 ou 96 poços, dependendo do procedimento experimental. Foram utilizados controles de células sem tratamento apenas com meio de cultura.

4.3.3 Ensaios de Viabilidade Celular

4.3.3.1 MTT

O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou Thiazolyl blue (MTT), para determinar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazam púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazam púrpura é determinado em 540 nm sendo proporcional à viabilidade celular (MOSMANN 1983). As células (1×10^4) foram incubadas por 24 horas,

em triplicata, com as nanopartículas em placas de 96 poços. Para as nanopartículas de TiO_2 foram utilizadas (2×10^4) células e placas de 12 poços. Depois de decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado uma nova alíquota de meio contendo MTT (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido de incubação por 2 h, a 37°C . O meio de cultura foi retirado e o precipitado formazan foi dissolvido com dimetilsulfóxido e a absorbância medida a 540 nm, em um leitor de microplacas (Organon Teknika, Belgium). A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada através de regra de três simples. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior será o número de células viáveis.

4.3.3.2 Vermelho Neutro

Este método está baseado na habilidade das células viáveis em incorporar e ligar o corante vermelho neutro nos lisossomas (REPETTO; DEL PESO e ZURITA 2008). As células (1×10^4) foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas com as nanopartículas durante 24 horas. Para as nanopartículas de TiO_2 foram utilizadas (2×10^4) células e placas de 12 poços. Decorrido o tempo de incubação, o meio foi substituído por 200 μL de meio de cultura contendo 0,05 mg/ml do vermelho neutro e incubado a 37°C e 5% de CO_2 durante 30 minutos. Posteriormente, a monocamada de células foi lavada 2 vezes com PBS para remoção do excesso de corante antes da extração do vermelho neutro incorporado aos lisossomas. A extração foi realizada em 200 μL de uma solução contendo 1% de ácido acético, 50% de etanol e 49% de água. Após a extração, a quantidade de vermelho neutro foi monitorada espectrofotometricamente em 540 nm. A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada através de regra de três simples. Portanto, quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior será o número de células viáveis.

4.3.4 Determinação da Curva de Concentração x Resposta

Para determinar a dependência de concentração versus efeito, (1×10^4) células foram incubadas por 24 horas, em concentrações crescentes, com as nanopartículas que em uma primeira triagem demonstraram ser citotóxicas. Todas as incubações foram feitas em estufa umidificada, a 37°C , com 5% CO_2 , seguido do ensaio do MTT ou do vermelho neutro. A IC_{50} , concentração que inibe 50% do crescimento celular, foi calculada através das curvas obtidas.

4.3.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Este método, proposto por Sauer e colaboradores (2003) consiste em avaliar a presença de espécies reativas no interior da célula, através da adição de acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) à célula. Esse composto é transformado no citoplasma em diclorofluoreceína reduzida (DCFH) pelas esterases, que por sua vez, na presença de espécies reativas de oxigênio, é oxidada em diclorofluoresceína (DCF), emitindo fluorescência. As células (3×10^5) foram distribuídas em placas de 12 poços, tratadas com as nanopartículas e mantidas por 24 horas a 37°C , com 5% de CO_2 , em estufa umidificada. Adicionou-se então às células DCFH-DA $10\mu\text{M}$, e estas foram mantidas por 30 minutos, a 37°C , com 5% CO_2 , em estufa umidificada. Posteriormente, a monocamada de células foi lavada delicadamente com solução de PBS a 37°C , tripsinizadas, transferidas para tubos de ensaio tipo eppendorf e lavadas por três vezes com PBS para remoção do corante não incorporado às células. A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55). A quantidade de proteína da amostra também foi analisada através de espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55) para normalização dos resultados. Os resultados foram obtidos como unidades de fluorescência e foram expressos em porcentagem de EROs em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 0%.

4.3.6 Extração e quantificação de DNA

O isolamento e quantificação de DNA foram realizados seguindo o método descrito na literatura (HAN 1997). As células, (1×10^6), foram distribuídas em placas de 6 poços e incubadas com as nanopartículas por 24 horas, a 37°C, com 5% de CO₂, em estufa umidificada. As células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas e transferidas para tubos tipo eppendorf. Posteriormente, as células foram lisadas com tampão contendo 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 mg/mL proteinase K e mantidas a 50 °C, por 2 h. O DNA foi precipitado com 2,5 V (125 µl) de etanol-NaCl e deixado em repouso *overnight*, a -25 °C. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x g, por 30 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol gelado 70%, secado à temperatura ambiente e posteriormente dissolvido em tampão (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA), contendo 0,6 g/mL de RNase A e incubado a 37 °C, por 1 h.

A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada espectrofotometricamente (SAMBROOK e RUSSELL 2001). As amostras foram diluídas a 1:100 em PBS, sendo a absorbância medida em 260 nm. A concentração de DNA foi calculada pela equação: concentração DNA (mg/mL) = (Abs/ε) x diluição (coeficiente de extinção (ε) = 20). As bases nitrogenadas da dupla fita de DNA apresentam uma absorção máxima no comprimento de onda de 260 nm. Neste comprimento de onda, o coeficiente de extinção igual a 20 indica que o DNA, em uma concentração de 1 mg/mL, tem uma absorbância (A_{260 nm}) igual a 20. A relação entre a concentração do DNA e a absorbância (A_{260 nm}) é linear até o valor de 2,0. A quantidade de DNA encontrada no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de DNA nas células viáveis e a quantidade de DNA nos demais tratamentos foi calculada através de regra de três simples.

4.3.7 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Para avaliar o efeito das nanopartículas sobre o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada uma sonda fluorescente (JC-1). Esta substância catiônica, penetra na membrana negativa da mitocôndria quando o potencial está estabelecido e apresenta-se na forma de agregados que emitem fluorescência vermelha. Quando há perda do potencial de membrana mitocondrial, ocorre a liberação desta sonda

para o citoplasma e a mesma passa à forma de monômeros que emitem fluorescência verde. Para o ensaio, (5×10^5) células foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas com as nanopartículas, por 24 horas. Após o tempo de incubação, adicionou-se o JC-1 ($10 \mu\text{g/mL}$) às células foram mantidas por 20 minutos a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram tripsinizadas, transferidas para tubos de ensaio tipo eppendorf e lavadas por três vezes com PBS. As células foram ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ de PBS, sendo utilizados $100 \mu\text{L}$ para leitura da fluorescência vermelha e verde em espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55). As duas fluorescências foram excitadas em 488 nm , a fluorescência vermelha foi detectada em 590 nm e a verde em 527 nm de emissão. O potencial mitocondrial foi calculado como uma taxa (vermelha/verde) para cada nanopartícula e para as células sem tratamento, e foi expresso em porcentagem, sendo as células sem tratamento consideradas como 100%. Como controle positivo foi utilizado o FCCP (Carbonyl Cyanide 4 (trifluoromethoxy) phenyl-hydrazine), um conhecido desacoplador do potencial de membrana mitocondrial.

4.3.8 Análise do Ciclo Celular

Para analisar o ciclo celular após tratamento com as nanopartículas, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, seguindo o método descrito por (YANG; WU; ZHANG et al. 2007). As células (4×10^5) foram incubadas com as nanopartículas por 24 h, em placas de 12 poços. Após o tempo de incubação, o meio de cultura contendo os tratamentos foi retirado, e as células foram soltas com tripsina e transferidas para tubos de ensaio tipo eppendorf. Após centrifugação por 10 minutos a 25°C e 1800 rpm , o decantado de células foi lavado com PBS e centrifugado novamente. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de etanol 70% e incubado por 30 minutos a -4°C . Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 mL de PBS + BSA 2% e centrifugado por 10 minutos à 25°C e 1800 rpm . Removido o sobrenadante, adicionou-se $0,5 \text{ mL}$ de RNase $100 \mu\text{g/mL}$ + 0,1% de triton-X em PBS, homogeneizado e passado para os tubos especiais para realizar a citometria. Os tubos foram mantidos em gelo até o momento da leitura. No momento da análise, adicionou-se $20 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo. A análise do DNA foi realizada através de um citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences). A população de células em

cada fase do ciclo celular foi determinada usando o programa adequado (WinMDI 2.9).

4.4 Estudos *in vivo*

Estes estudos foram realizados em colaboração com a pesquisadora Claudriana Locatelli da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe – UNIARP- Caçador/SC. O tratamento dos animais, assim como as coletas das amostras, o hemograma e análise dos parâmetros bioquímicos séricos foram realizados na UNIARP. As nanopartículas escolhidas para as avaliações *in vivo* foram F3, F5, F9 e TiO₂. F3 e F5 são nanopartículas lipídicas, sendo que a F5 parece ser mais citotóxica nos ensaios *in vitro*, e a F3 parece não apresentar citotoxicidade nestes ensaios. As nanopartículas F9 e de TiO₂ foram escolhidas por serem dos tipos polimérica e metálica, respectivamente.

4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos com idade de dois meses, fornecidos pelo biotério da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe – UNIARP – Caçador/SC. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (15x36x30 cm) forradas com serragem, substituída a cada três dias para manutenção e higiene das gaiolas. Durante o período de permanência no biotério e durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida em ambiente com temperatura de 23±1°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe - UNIARP, o qual foi aprovado sob parecer número 137/08.

4.4.2 Avaliação da toxicidade *in vivo* das nanopartículas

Para avaliação da toxicidade das nanopartículas, os camundongos foram divididos em cinco grupos de seis animais, com exceção do grupo controle que continha 12 animais. Os animais receberam os tratamentos como mostrado na figura 7, por via intraperitoneal (Fig 8) durante 10 dias, uma vez ao dia. Grupo I: solução salina, Grupo II: nanopartícula F3, Grupo III: nanopartícula F5; Grupo IV: nanopartícula F9; Grupo V: nanopartícula de TiO₂.

Os parâmetros de toxicidade utilizados consistiram na avaliação da variação de peso corporal, exame anatomopatológico ante e post-mortem, hemograma e testes bioquímicos de funções hepática e renal, além da avaliação do perfil lipidêmico dos animais tratados. Para examinar mudanças morfológicas, o cérebro, pulmão, coração, rins, fígado, baço e estômago foram removidos e pesados. A avaliação do peso corporal foi realizada individualmente no início e ao término do tratamento.

Ao longo do tratamento foram investigados sinais indicativos de toxicidade sistêmica tais como alterações no consumo de água e alimento, e na produção de fezes e urina.

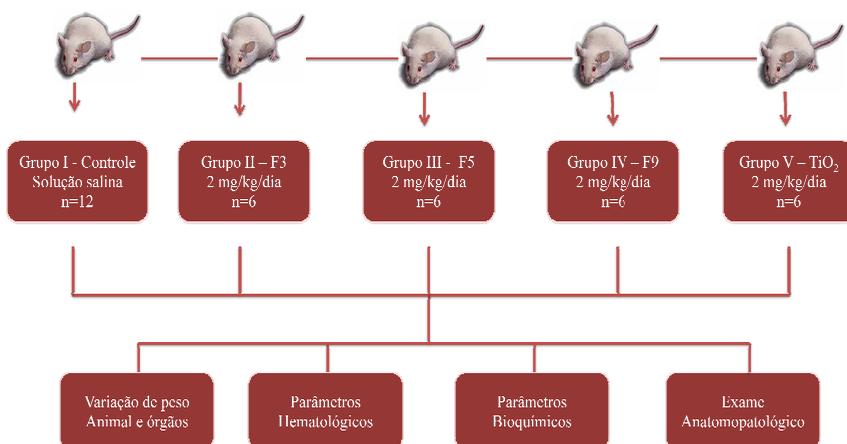


Figura 7 Delineamento do estudo de toxicidade *in vivo*.



Figura 8 Administração das nanopartículas via intraperitoneal

A retirada do sangue foi realizada nos animais anestesiados em atmosfera saturada de éter etílico a partir do canto medial do olho (plexo orbital) utilizando tubos capilares, para a determinação de microhematócrito (Perfecta®). O sangue coletado foi processado para a realização de hemograma e das análises bioquímicas. Foram realizadas dosagem de hemoglobina, determinação de hematócrito, contagem de hemácias e leucócitos, determinação do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM) e concentração da hemoglobina celular média (CHCM). A contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo e foram determinados valores relativos de polimorfos e mononucleares. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se como diluidor o líquido de Dacie e de Turk, respectivamente. Na determinação dos parâmetros bioquímicos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e gama-glutamil transferase (γ GT) e na determinação de proteínas totais, uréia e creatinina foram utilizados kits comerciais da Labtest® (Lagoa Santa/MG), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (técnica semi automatizada em analisador bioquímico Thermo Plate Analyzer®).

4.5 Avaliação estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM); cada experimento foi repetido pelo menos três vezes e em triplicata. Para a análise estatística, foram utilizados os programas GraphPad Prism 5 e Origin 6.1. Para a avaliação estatística *in vitro*, foram utilizadas as análises de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Dunnett. Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Bonferroni.

5. Resultados e discussão

5.1 Nanopartículas lipídicas e poliméricas

Foram estudadas oito nanopartículas lipídicas, com diferenças quanto à natureza do lipídio e tensoativos utilizados na preparação, além de uma nanopartícula polimérica. As nanopartículas foram nomeadas F1, F2, F3, F4, F5, F7 e F8 para as nanopartículas lipídicas e F9 para a nanopartícula polimérica.

5.1.1 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas quanto à natureza do lipídio ou polímero utilizado na preparação da nanopartícula, tipo de tensoativo, tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, e a caracterização está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização das nanopartículas lipídicas e poliméricas

Nanopartícula Nome	Lipídio/ Polímero	Tensoativo	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
F1	Vaselina sólida branca (USP)	Tween 80	128 ± 4,1	0,32±0,02	-18
F2	<i>Butyrisoermum parkii</i>	Tween 80	144 ± 3,2	0,21±0,05	-23
F3	<i>Virola surinamensis</i>	Tween 80	135 ± 2,5	0,17±0,08	-30
F4	Tristearin	Tween 80	110 ± 4,5	0,22±0,06	-26
F5	Tristearin	SDS	116 ± 3,5	0,21±0,05	-39
F7	<i>Theobroma cacao</i>	Tween 80	167 ± 5,2	0,18±0,03	-41
F8	<i>Platonia esculenta</i>	Tween 80	173 ± 2,4	0,19±0,02	-20
F9	Poliuretano	Tween 80	249 ± 5,7	0,3±0,04	-42

5.1.2 Avaliação da toxicidade *in vitro*

5.1.2.1 Ensaios de citotoxicidade das nanopartículas

Para determinar se a toxicidade celular ocorre, numa primeira fase, foram utilizados dois ensaios de viabilidade e citotoxicidade *in vitro*, utilizando linhagens de células Vero e MDCK. Células Vero vem sendo utilizadas com alguma frequência, com as vantagens de fácil acesso e crescimento rápido (BOUAZIZ; ABID-ESSEFI; BOUSLIMI et al. 2006; VAUCHER; TEIXEIRA e BRANDELLI 2010), e tem sido

sugerido como um modelo adequado para estudo de nefrotoxicidade (DIAS; ANDRADE; ALVERCA et al. 2009), bem como a linhagem de células MDCK (REZZANI; ANGOSCINI; BORSANI et al. 2002). Estes modelos podem ser usados para estudar a citotoxicidade *in vitro* e prever o potencial de toxicidade *in vivo* nos rins.

Mais de um tipo de ensaio deve ser usado para determinar a viabilidade celular *in vitro*, uma vez que aumenta a confiabilidade dos resultados. Os sais de tetrazólio, que incluem o MTT e análogos, são meios de medir a atividade das células vivas mediante a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais que decompõem o anel de tetrazólio, formando um produto que pode ser monitorado colorimetricamente, fornecendo assim, informações sobre a atividade metabólica da célula (MOSMANN 1983). Já o ensaio de viabilidade do vermelho neutro é baseado na habilidade das células viáveis de incorporar e vincular corante vermelho neutro nos lisossomas, e dessa forma, prever a citotoxicidade através da atividade lisossomal (REPETTO; DEL PESO e ZURITA 2008).

Por meio do ensaio do MTT, as nanopartículas F1, F2, F4 e F5 demonstraram ser citotóxicas para linhagem Vero, e a nanopartícula F5 apenas para a linhagem MDCK, o que sugere que estas nanopartículas interferem no metabolismo mitocondrial das células, e que a linhagem de células Vero é mais sensível aos efeitos das nanopartículas do que a linhagem MDCK (Fig. 9). Por outro lado, a absorção do corante vermelho neutro ocorre através de um processo que requer energia, sendo sensíveis as substâncias que interferem com a membrana celular e a atividade lisossomal, bem como o processo de endocitose dependente de energia (REPETTO; DEL PESO e ZURITA 2008). As nanopartículas F4 e F5 apresentaram citotoxicidade para ambas as linhagens através do ensaio do vermelho neutro, porém F5 parece diminuir mais expressivamente a viabilidade celular (Fig. 10). Comparando os dois métodos de viabilidade celular, as nanopartículas consideradas citotóxicas parecem promover mudanças na atividade mitocondrial e interferência na atividade lisossomal. Há também evidências de que a liberação do conteúdo lisossomal para o citosol pode iniciar a cascata de apoptose, levando também à liberação de fatores pró-apoptóticos pelas mitocôndrias (ZHAO; ANTUNES; EATON et al. 2003).

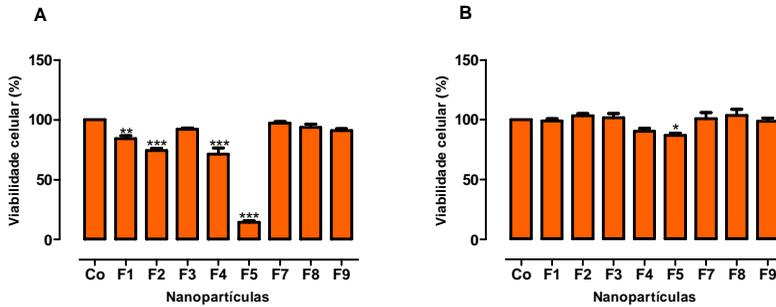


Figura 9 - Citotoxicidade de nanopartículas em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). As células foram incubadas com 500 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas, por 24 h, e a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio do MTT. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Para as nanopartículas que apresentaram algum grau de citotoxicidade, curvas concentração-resposta foram obtidas. As concentrações de nanopartículas utilizadas para determinação da IC_{50} para citotoxicidade variou de 0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, e os resultados estão apresentados na Tabela 3. As nanopartículas F1 e F4 demonstraram citotoxicidade para linhagem celular Vero, com alto valor de IC_{50} . Como também pode ser visto na tabela 3, a nanopartícula F5 apresentou maior citotoxicidade para as células Vero, com IC_{50} relativamente menor. Estes valores de IC_{50} foram usados como parâmetros para os ensaios realizados na sequência.

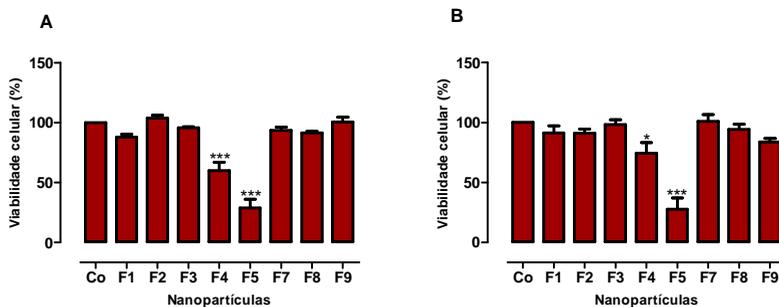


Figura 10 - Citotoxicidade de nanopartículas em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). As células foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas, por 24 h, e a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio do vermelho neutro. Os valores de * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Tabela 3 - Valores de IC_{50} para os ensaios de viabilidade MTT e vermelho neutro, em 24 h, para as linhagens celulares Vero e MDCK.

NPs	IC_{50} (MTT)		IC_{50} (NR)	
	Vero	MDCK	Vero	MDCK
F1	489 \pm 4,9	nd	nd	nd
F4	682 \pm 6,7	nd	694 \pm 9,3	nd
F5	247 \pm 7,2	603 \pm 2,7	643 \pm 2,4	586 \pm 15,0

* NPs - nanopartículas

* nd - não demonstrado

Para entender os mecanismos da toxicidade de nanopartículas nas células, investigamos se o estresse oxidativo estaria envolvido na morte induzida devido a presença de estruturas nanométricas no meio de

cultivo. A produção de EROs intracelular foi avaliada pelo método da acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Exceto F1 na linhagem celular MDCK, todas as nanopartículas induziram o estresse oxidativo (Fig. 11), o que poderia explicar a citotoxicidade de algumas nanopartículas para as células. Como um dos mecanismos tóxicos das nanopartículas, a geração de EROs parece ser mais extensamente estudada (PARK; YI; CHUNG et al. 2008; WANG; GAO; LAN et al. 2009; AHAMED 2011; SHUKLA; SHARMA; PANDEY et al. 2011). Há alguns relatos de que a geração de EROs foi encontrada nas células tratadas com diferentes tipos e concentrações de nanopartículas, como TiO_2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (PARK; YI; CHUNG et al. 2008; SHUKLA; SHARMA; PANDEY et al. 2011), nanotubos de carbono (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (FOUCAUD; GOULAOUIC; BENNASROUNE et al. 2010), ZnO (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (DE BERARDIS; CIVITELLI; CONDELLO et al. 2010), SiO_2 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (WANG; GAO; LAN et al. 2009), entre outras. O estresse oxidativo tem sido proposto como um mecanismo comum de lesão celular induzido por vários tipos de nanopartículas (PARK; YI; CHUNG et al. 2008). No entanto, é importante ressaltar que existe um complexo sistema de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para proteger o organismo contra agentes pró-oxidantes (REUTER; GUPTA; CHATURVEDI et al. 2010), e o aumento da produção de EROs, apenas sem um proporcional aumento na produção de antioxidantes, pode induzir a permeabilidade da membrana mitocondrial e danos à cadeia respiratória, o que pode desencadear o processo de apoptose (VALKO; RHODES; MONCOL et al. 2006). Então, apesar de algumas nanopartículas lipídicas e poliméricas estudadas aqui aumentarem a geração de EROs, esse aumento não culminou necessariamente na morte celular.

Da mesma forma, as mitocôndrias têm um papel crucial no controle do processo de morte celular, além de desempenhar uma função importante na manutenção do status bioenergético celular (SZABO; BALOG; MARK et al. 2011). O comprometimento da função mitocondrial pelas nanopartículas pode ter consequências drásticas, perturbando o equilíbrio e funções da célula (TEODORO; SIMÕES; DUARTE et al. 2011). Considerando nossos ensaios, somente para as nanopartículas F4 e F5 a geração de EROs parece envolver a mitocôndria no processo de morte celular, uma vez que encontramos uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial nos tratamentos com estas nanopartículas, nas linhagens Vero e MDCK, respectivamente (Fig. 12).

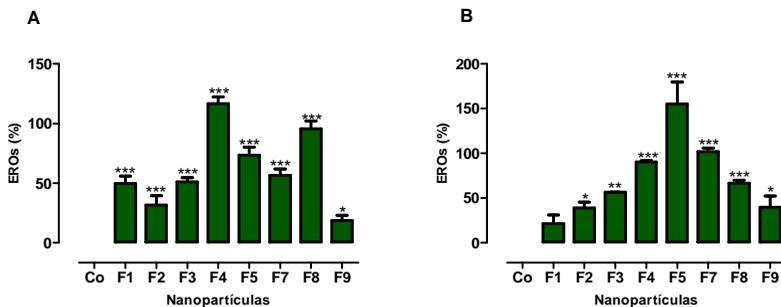


Figura 11 - Efeito das nanopartículas na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). A geração de EROs foi determinada através da sonda DCFH-DA, conforme descrito nos métodos. As células foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das nanopartículas, por 24 h, com exceção da F5 na linhagem celular Vero, em que foi usada a menor IC_{50} encontrada nos ensaios de viabilidade celular (247 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Os resultados estão expressos como o percentual de fluorescência em comparação com as células sem tratamento. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

As diferenças observadas na avaliação da citotoxicidade induzida pelas nanopartículas entre as linhagens celulares VERO e MDCK se deve, provavelmente, às diferenças nas características de cada linhagem celular frente a um estresse oxidativo, por exemplo. Por esta razão, utilizamos duas linhagens celulares para analisar a viabilidade e monitorar pelo menos duas diferentes funções celulares.

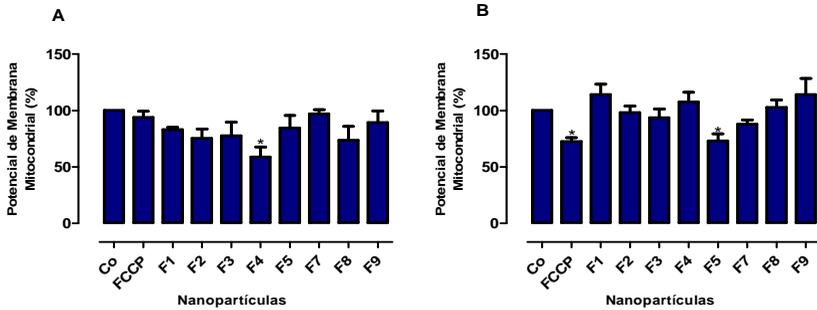


Figura 12 - Efeito das nanopartículas no potencial de membrana mitocondrial em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). O potencial de membrana mitocondrial foi determinado através da sonda JC-1, conforme descrito nos métodos. As células foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das nanopartículas, por 24 h, com exceção da F5 na linhagem celular Vero, em que foi usada a menor IC_{50} encontrada nos ensaios de viabilidade celular (247 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Os resultados são expressos como o percentual de fluorescência em comparação com as células sem tratamento. O valor de $*p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Através da citometria de fluxo é possível perceber que as células Vero não apresentaram alterações significativas no ciclo celular após o tratamento com as nanopartículas (Fig. 13). Avaliando-se o ciclo celular da linhagem MDCK (Fig. 14), foi possível confirmar a citotoxicidade encontrada com os ensaios de viabilidade MTT e vermelho neutro, além de predizer o tipo de morte celular gerada pelas nanopartículas. O cultivo das células com a nanopartícula F5 diminuiu a população de células MDCK na fase G0/G1 e G2/M, acompanhado por um aumento acentuado da população de células na fase Sub/G1, após 24 h de tratamento. O conteúdo de DNA na fase Sub/G1 se refere à proporção de células em apoptose (ORMEROD 2002; YANG; WU; ZHANG et al. 2007).

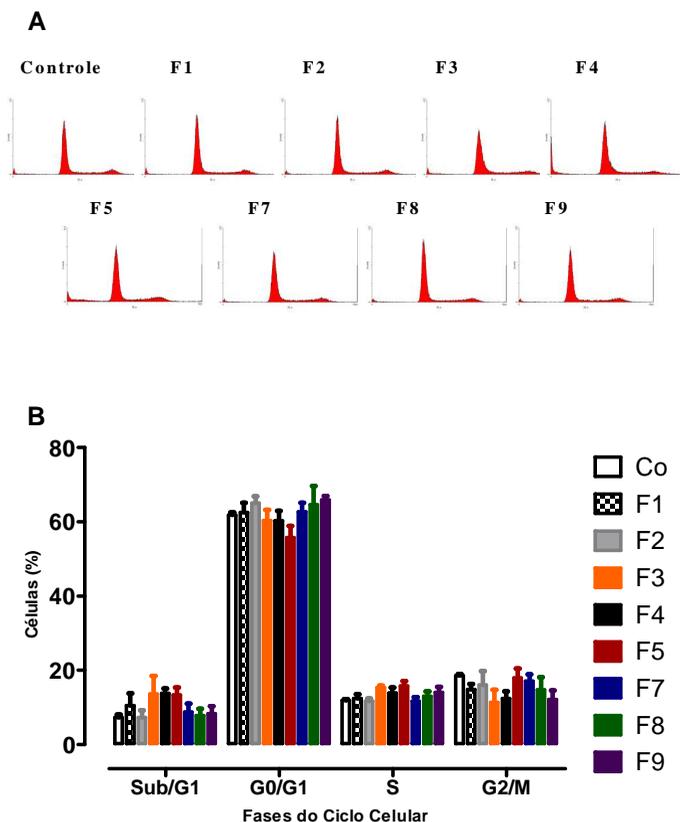


Figura 13 - Efeito das nanopartículas sobre a distribuição das células Vero no ciclo celular. (A) Histogramas mostram as células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com as nanopartículas. (B) As células foram tratadas com 500 $\mu\text{g/mL}$ das nanopartículas, por 24 h, com exceção da F5 na linhagem de células Vero, em que foi usada a menor IC_{50} encontrada nos ensaios de viabilidade celular (247 $\mu\text{g/mL}$), e analisados por citometria de fluxo. G0/G1, G2/M e S indicam a fase da célula, e sub/G1 refere-se à proporção de células apoptóticas. Cada fase foi calculada usando o programa WinMDI 2.9. A análise estatística foi realizada separadamente, comparando-se o controle de cada fase com os respectivos tratamentos.

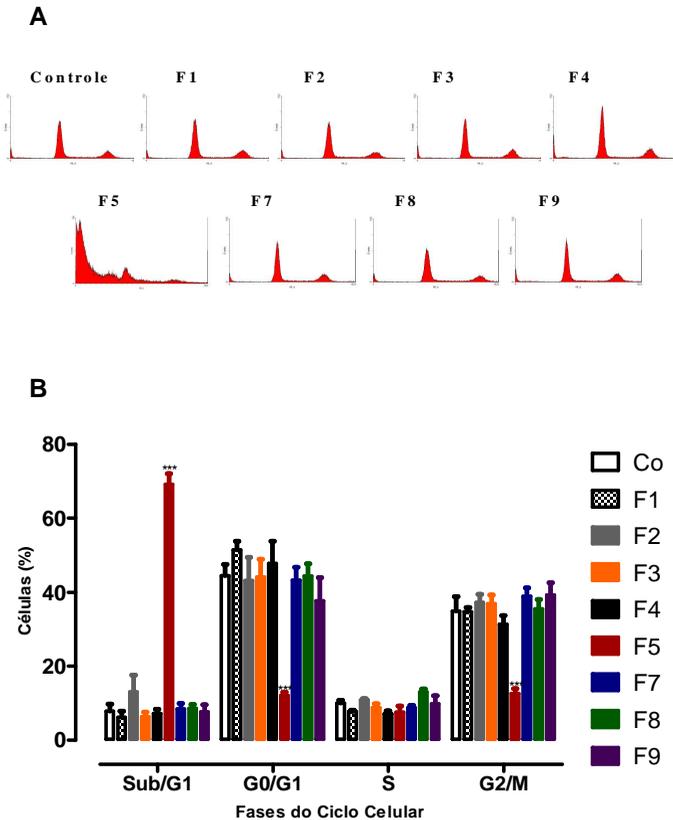


Figura 14- Efeito das nanopartículas sobre a distribuição das células MDCK no ciclo celular. (A) Histogramas mostram as células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com as nanopartículas. (B) As células foram tratadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das nanopartículas, por 24 h, com exceção da F5 na linhagem de células Vero, em que foi usada a menor IC_{50} encontrada nos ensaios de viabilidade celular (247 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e analisados por citometria de fluxo. G0/G1, G2/M e S indicam a fase da célula, e sub/G1 refere-se à proporção de células apoptóticas. Cada fase foi calculada usando o programa WinMDI 2.9. O valor de $*p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett. A análise estatística foi feita separadamente, comparando o controle de cada fase com os respectivos tratamentos.

Em conclusão, as nanopartículas lipídicas e poliméricas estudadas mostraram-se biocompatíveis, uma vez que apenas algumas delas mostraram toxicidade relativamente baixa. Até mesmo a formulação F5 que se mostrou mais citotóxica quando comparada com as demais, esta parece induzir a morte celular com concentrações muito elevadas, se compararmos com a citotoxicidade induzida por nanopartículas metálicas como TiO_2 , que com $10 \mu\text{g}$ já demonstrou ser citotóxico para as mitocôndrias (FREYRE-FONSECA; DELGADO-BUENROSTRO; GUTIÉRREZ-CIRLOS et al. 2011). Além disso, mesmo para a formulação F4 que também apresentou citotoxicidade, embora menor do que a F5, a IC_{50} para a viabilidade celular MTT é muito alta, $\sim 700 \mu\text{g}/\text{mL}$ para ambas as linhagens celulares testadas. A razão da maior citotoxicidade da formulação F5 parece ser, provavelmente, pela presença de SDS como tensoativo nesta formulação. Recentemente, Caon e colaboradores (2010) relataram que as nanopartículas produzidas com SDS são mais citotóxicas quando comparadas com nanopartículas produzidas com outro tipo de tensoativo (CAON; ZANETTI-RAMOS; LEMOS-SENNA et al. 2010). O SDS mostrou ser potencialmente irritante em testes de compatibilidade realizados em cultura de células, em particular devido à sua capacidade de solubilização de lipídios de membrana (SPIEKSTRA; DOS SANTOS; SCHEPER et al. 2009). No entanto, deve-se observar que os efeitos citotóxicos de sistemas nanoestruturados diferem dependendo da linhagem celular utilizada, devido às diferenças metabólicas, como por exemplo, a presença de enzimas. Basicamente, as nanopartículas testadas aqui são biocompatíveis se usadas em baixas concentrações. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de ação destas estruturas em nanoescala, a fim de determinar as implicações do uso crescente e generalizado.

5.1.3 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Com base nos resultados da avaliação da toxicidade das nanopartículas lipídicas e poliméricas *in vitro*, foram selecionadas três nanopartículas entre estas para a avaliação da toxicidade *in vivo*. As nanopartículas F3 e F9 foram selecionadas por serem do tipo lipídica e

polimérica, respectivamente, e ambas não citotóxicas *in vitro*, e a nanopartícula F5, por ter-se mostrado citotóxica nestes ensaios.

A dose da nanopartícula administrada aos animais foi determinada em função do volume máximo possível de ser aplicado no animal por via IP (0,3 mL). Assim, considerando o peso do animal em torno de 30 g foi determinada a dose de 2 mg/kg/dia. Os parâmetros de toxicidade avaliados incluíram variação de peso corporal, exame anatomopatológico ante e pos-mortem, hemograma e testes bioquímicos de funções hepática, renal e parâmetros lipídêmicos.

Todos os animais toleraram as injeções intraperitoneais de nanopartículas. Ao longo dos 10 dias de tratamento com as nanopartículas não foram identificadas alterações no consumo de água, alimento, na produção de fezes e urina. Os animais desenvolveram-se normalmente e nenhum animal morreu durante os experimentos.

Os animais foram pesados no início e ao final dos tratamentos com as nanopartículas, e foi possível verificar um aumento significativo na variação de peso dos animais tratados com as nanopartículas, quando comparados com o controle (Tab.4).

Tabela 4 - Variação do peso corpóreo após tratamento com as nanopartículas

Parâmetros	Controle	F3	F5	F9
Variação peso (g)	3,5 ± 0,5	5,33 ± 0,91*	5,66 ± 0,98*	5,50 ± 0,95*

Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

A retirada do sangue foi realizada nos animais anestesiados em atmosfera saturada de éter etílico, a partir do canto medial do olho (plexo orbital) utilizando tubos capilares (Fig 15). Não foi identificada nenhuma alteração macroscópica dos órgãos ou na cavidade abdominal dos camundongos tratados com as nanopartículas lipídicas e poliméricas (Fig. 16).



Figura 15 – Retirada do sangue através do plexo orbital



Figura 16 – Avaliação macroscópica dos órgãos e cavidade abdominal *pós-mortem*

O peso dos órgãos dos animais tratados também foi avaliado, conforme descrito na Tabela 5. Houve uma diminuição significativa no peso do estômago, coração e rins dos animais tratados com a nanopartícula F3, além de uma diminuição do peso do baço, estômago e fígado dos animais tratados com as nanopartículas F5. Da mesma forma, alterações no peso dos órgãos dos animais tratados com a nanopartícula F9 também foram identificadas, com aumento significativo do peso do baço, e diminuição do peso do estômago e rins, quando comparados

com os animais controle. A diferença no peso do estômago pode ser devido a um maior acúmulo de restos de alimento no estômago do animal, já que é feita a retirada desse material, pelo menos em grande parte, antes da pesagem do órgão.

Tabela 5 - Peso dos órgãos

Órgãos	Controle	F3	F5	F9
Baço	0,182 ± 0,012	0,194 ± 0,020	0,159 ± 0,015*	0,271 ± 0,009*
Cérebro	0,374 ± 0,021	0,359 ± 0,015	0,354 ± 0,025	0,349 ± 0,007
Estômago	0,373 ± 0,008	0,309 ± 0,012*	0,301 ± 0,017*	0,304 ± 0,025*
Pulmão	0,254 ± 0,019	0,248 ± 0,013	0,243 ± 0,016	0,244 ± 0,006
Fígado	2,052 ± 0,139	1,974 ± 0,114	1,846 ± 0,087*	2,037 ± 0,069
Coração	0,207 ± 0,023	0,155 ± 0,007*	0,192 ± 0,016	0,174 ± 0,017
Rins	0,252 ± 0,021	0,200 ± 0,014*	0,229 ± 0,015	0,211 ± 0,013*

Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Para avaliar a toxicidade produzida pelas nanopartículas, os parâmetros hematológicos dos animais foram determinados e comparados com os respectivos valores obtidos com o grupo controle. Os resultados dos parâmetros hematológicos dos animais estão descritos na Tabela 6.

É possível verificar que houve um aumento significativo no número de hemácias e uma diminuição no VCM das hemácias, além de um aumento de mais de 10% no número de neutrófilos dos animais tratados com a nanopartícula F3, quando comparado com os animais controle. O aumento no número de neutrófilos também foi identificado após o tratamento com as nanopartículas F5 e F9, assim como uma diferença significativa no VCM das hemácias e na porcentagem de basófilos dos animais tratados com a F9.

Tabela 6 - Parâmetros hematológicos dos animais controles e tratados.

Parâmetros	Controle	F3	F5	F9
Hemácias (/mm ³)	5.937.000 ± 457	7.615.000 ± 113*	5.582.000 ± 366	5.695.000 ± 366
Leucócito (/mm ³)	7.691 ± 689	5.450 ± 334	5.108 ± 500	4.066 ± 780
VCM (fL)	71 ± 3	63 ± 2*	73 ± 2	66 ± 3*
HCM (pg)	23 ± 3	21 ± 4	25 ± 3	21 ± 3
CHCM (%)	31 ± 2	33 ± 4	34 ± 3	31 ± 3
Hemoglobina (g/dL)	14 ± 2	16 ± 3	14 ± 3	12 ± 2
Hematócrito (%)	43 ± 2	48 ± 6	41 ± 7	38 ± 4
Neutrófilo (%)	14,51 ± 2,13	26,15 ± 1,80*	20,83 ± 2,88*	21,5 ± 4,33*
Mononuclear (%)	85,66 ± 3,07	73,66 ± 2,89	78 ± 4,16	72 ± 5
Eosinófilo (%)	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
Basófilo (%)	2,5 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	7 ± 3*

Abreviaturas: VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular). Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos dos animais estão descritos na tabela 7. Os animais tratados com a nanopartícula F9 tiveram um aumento significativo nos valores de ALT e AST, além de uma diminuição no colesterol total. Alterações nos níveis das enzimas ALT e AST são considerados indicativos de dano hepático (WANG; ZHOU; CHEN et al. 2007; PATRA; ABDEL MONEIM; WANG et

al. 2009). Os animais tratados com a nanopartícula F3 apresentaram um aumento significativo na concentração sérica de uréia. A uréia é um metabólito associado à funcionalidade dos rins, e um aumento dos níveis séricos deste metabólito pode indicar toxicidade renal (LASAGNA-REEVES; GONZALEZ-ROMERO; BARRIA et al. 2010).

Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos dos animais controles e tratados.

Parâmetros	Controle	F3	F5	F9
ALT (UI/L)	111 ± 9	87 ± 6,10	93 ± 15	170 ± 25*
AST (UI/L)	101 ± 10	97 ± 5,6	70 ± 9	123 ± 7,19*
Albumina (g/dl)	2,30 ± 0,05	2,24 ± 0,068	2,38 ± 0,091	2,39 ± 0,027
Proteínas totais (g/dL)	5,07 ± 0,19	4,93 ± 0,3	5,4 ± 0,14	4,83 ± 0,401
Uréia (mg/dL)	62 ± 5	72 ± 3,77*	62 ± 2,67	53 ± 2,48
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,08	0,44 ± 0,06	0,39 ± 0,008	0,47 ± 0,02
Triglicerídeos (mg/dl)	97 ± 19	83,21 ± 5,74	72,81 ± 6,3	82 ± 15
Colesterol Total (mg/dl)	91 ± 12	98 ± 2,54	104 ± 5,35	74,5 ± 7,55*

Abreviaturas: ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Assim, é possível perceber que ao contrário dos resultados *in vitro*, a nanopartícula F5 não demonstrou toxicidade para os animais, pelo menos no que diz respeito aos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Já as nanopartículas F3 e F9 demonstraram toxicidade

renal e hepática, respectivamente, através de parâmetros bioquímicos que são usados para identificar tais alterações.

5.2 Nanopartículas de TiO_2 e ácido fosfotúngstico (HPW)

5.2.1 Caracterização das nanopartículas de TiO_2

Foi utilizada uma suspensão de nanopartículas de TiO_2 10 % em água deionizada (pH 7,9) para todos os ensaios de toxicidade. As nanopartículas estavam na forma de uma suspensão contendo uma mistura de anatase e rutilo, com partículas de diâmetro médio de 50 nm, com base no laudo de análise do fornecedor (Sigma-Aldrich). Anatase e rutilo são duas das três formas minerais do TiO_2 . A figura 17 mostra a imagem de duas nanopartículas isoladas, sendo que a maior apresenta diâmetro de aproximadamente 50 nm.

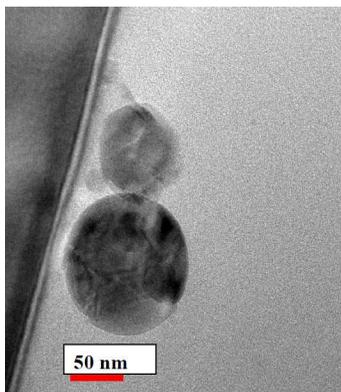


Figura 17 – Micrografia eletrônica de transmissão da nanopartícula de TiO_2 . Fonte: (GONÇALVES 2011).

5.2.2 Avaliação da toxicidade *in vitro*.

5.2.2.1 Ensaios de citotoxicidade das nanopartículas

Com o aumento da aplicação das nanopartículas de TiO_2 não somente como semi condutor na fotocatalise heterogênea, mas também na produção de inúmeros produtos disponíveis comercialmente, vários estudos *in vitro* e *in vivo* avaliando os potenciais riscos destas nanopartículas para os humanos tem recebido maior atenção nos últimos anos (PARK; YI; CHUNG et al. 2008; DROBNE; JEMEC e PIPAN TKALEC 2009; ZHU; WANG; CHAO et al. 2009; GONÇALVES; CHIASSON e GIRARD 2010; HUSSAIN; THOMASSEN; FERECATU et al. 2010). A exposição às nanopartículas de TiO_2 pode levar a distúrbios nos mecanismos homeostáticos da célula, e dependendo da concentração e do tempo de exposição, pode resultar em um dano irreversível e morte celular (HUSSAIN; THOMASSEN; FERECATU et al. 2010). Com isso, os ensaios *in vitro* são frequentemente utilizados no rastreamento de possíveis efeitos biológicos antes dos ensaios *in vivo*, levando a uma redução do uso de animais de pesquisa (MONTEIRO-RIVIERE; INMAN e ZHANG 2009). Neste trabalho, os ensaios de citotoxicidade realizados para as nanopartículas de TiO_2 também foram feitos com o HPW, a fim de avaliar a citotoxicidade destas substâncias separadamente, para só então iniciar os experimentos com as nanopartículas de TiO_2 com o HPW adsorvido.

Para ambas as substâncias, foram realizados dois ensaios de viabilidade celular, o MTT e vermelho neutro, nas linhagens celulares Vero e MDCK. Nos primeiros ensaios com o TiO_2 , foi possível perceber que este se depositava no fundo da placa de ensaio, o que poderia impedir o crescimento das células já que estas são linhagens que crescem apenas aderidas. Dessa forma, para todos os ensaios realizados com estas nanopartículas, foram utilizadas placas de no mínimo 12 poços. O HPW é um superácido, e por conta disso foi verificado o pH do meio de cultura após incubá-lo com as células, a fim de impedir que uma alteração do pH do meio pudesse interferir no crescimento das células. Possivelmente o tampão utilizado no meio de cultura, ou mesmo o pequeno volume da solução estoque do HPW utilizado nos ensaios impediram que houvesse uma alteração do pH do meio.

As nanopartículas de TiO_2 não parecem ser citotóxicas para as linhagens celulares testadas, em nenhum dos ensaios de viabilidade. Os resultados destes ensaios sugerem um aumento na viabilidade celular, em ambas as linhagens e para ambos os ensaios (Fig. 18 e 19). Outros ensaios foram realizados na sequência a fim de confirmar estes resultados, visto que muitos trabalhos já demonstraram a citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 *in vitro* (GONÇALVES; CHIASSON e GIRARD 2010; SHI; WANG; HE et al. 2010; FREYRE-FONSECA; DELGADO-BUENROSTRO; GUTIÉRREZ-CIRLOS et al. 2011)

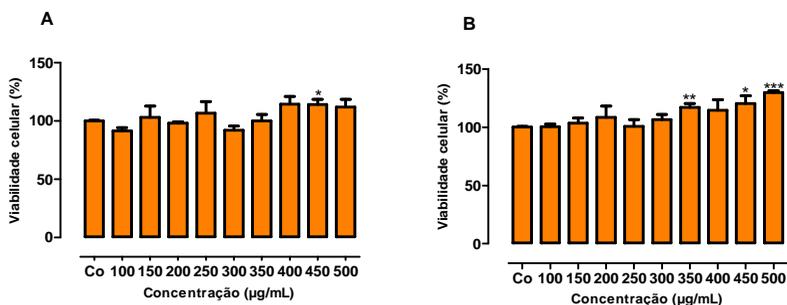


Figura 18 - Citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B), pelo método do MTT. As células foram incubadas com concentrações crescentes de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas, por 24 h. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

O HPW mostrou-se citotóxico em ambos os ensaios de viabilidade, a partir da concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ para o MTT na célula Vero (Fig. 20), e a partir de 200 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem Vero e 300 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem MDCK, no ensaio do vermelho neutro (Fig. 21), o que sugere que esta substância interfere tanto no metabolismo mitocondrial quanto na atividade lisossomal das células, sendo mais evidente esta toxicidade para o lisossoma e para linhagem Vero. Não foram encontrados trabalhos que tratam do estudo da toxicidade deste ácido.

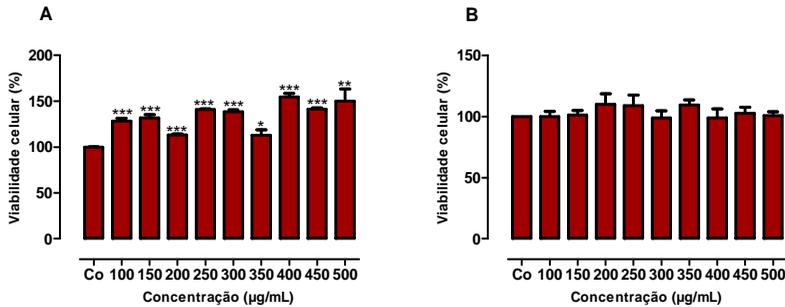


Figura 19 - Citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B) pelo método do vermelho neutro. As células foram incubadas com concentrações crescentes de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas, por 24 h. Os valores de $*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

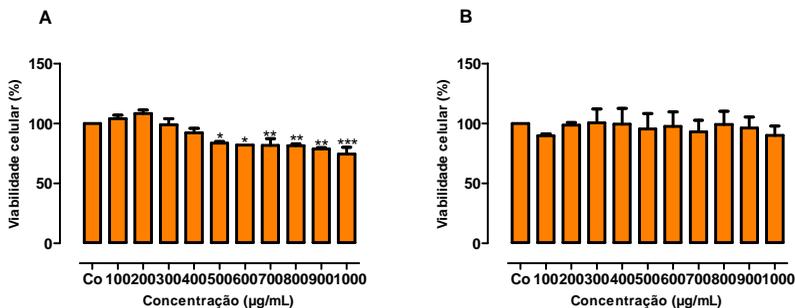


Figura 20 - Citotoxicidade do HPW em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B), pelo método do MTT. As células foram incubadas com concentrações crescentes de 0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ do ácido, por 24 h. Os valores de $*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

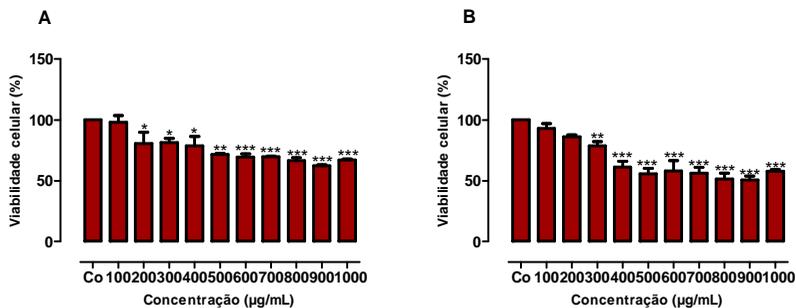


Figura 21 - Citotoxicidade do HPW em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B), pelo método do vermelho neutro. As células foram incubadas com concentrações crescentes de 0 a 1000 µg/mL do ácido, por 24 h. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Um dos mecanismos de toxicidade das nanopartículas de TiO_2 é a produção de EROs (SHUKLA; SHARMA; PANDEY et al. 2011). Existem evidências da relação entre a exposição às nanopartículas de TiO_2 e inflamação pulmonar (HUSSAIN; THOMASSEN; FERECATU et al. 2010), podendo a inflamação acometer também outros tecidos como fígado, rins e cérebro, e a geração de EROs é considerada responsável, pelo menos em parte, por esse processo (LI; LI; YIN et al. 2010). Em um estudo recente, Shukla e colaboradores (2010) demonstraram através de ensaios *in vitro*, a geração de EROs em linhagem de células de epiderme humana A431, sugerindo a relação direta entre estresse oxidativo e genotoxicidade, com dano ao DNA e formação de micronúcleos causado por nanopartículas de TiO_2 (Fig.22) (SHUKLA; SHARMA; PANDEY et al. 2011).

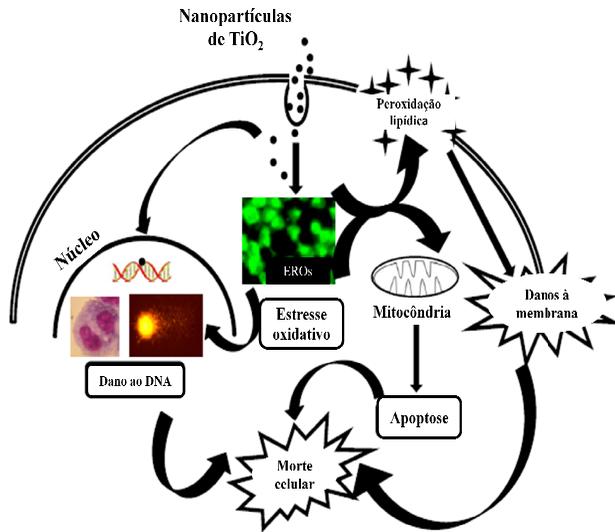


Figura 22 - Possíveis mecanismos de genotoxicidade induzida por nanopartículas de TiO₂ em células de epiderme humana. Adaptado de (SHUKLA; SHARMA; PANDEY et al. 2011).

É possível verificar um aumento na geração de EROs em ambas as linhagens celulares quando tratadas com 500 µg/mL da nanopartícula de TiO₂, e um aumento dessa geração apenas para linhagem MDCK, quando tratada com o HPW (Fig. 23). Apesar do aumento na geração de EROs em ambas as linhagens, é importante ressaltar que existe uma diferença significativa na concentração de TiO₂ responsável por este aumento em nossos ensaios, e a concentração que outros autores usaram em seus experimentos. Liu e colaboradores (2010), utilizaram células derivadas de feocromocitoma de medula, a linhagem PC12, e com apenas 25 µg/mL de nanopartículas de TiO₂ já encontraram um aumento na geração de EROs (LIU; XU; ZHANG et al. 2010). Em um outro trabalho, Sha e colaboradores pesquisaram a citotoxicidade do TiO₂ em quatro linhagens de células diferentes, e com apenas 10 µg/mL de nanopartículas já encontraram um aumento significativo na geração de EROs (SHA; GAO; WANG et al.). Da mesma forma, Park e colaboradores (2008), com apenas 5 µg/mL da nanopartícula já encontraram aumento significativo de EROs em linhagem de células de

epitélio brônquico humano BEAS-2B (PARK; YI; CHUNG et al. 2008). Além disso, é importante ressaltar, como já mencionado anteriormente, que apenas um aumento da geração de EROs, sem um aumento proporcional das enzimas antioxidantes é que pode induzir a permeabilidade da membrana mitocondrial e danos à cadeia respiratória, o que pode desencadear o processo de morte (VALKO; RHODES; MONCOL et al. 2006).

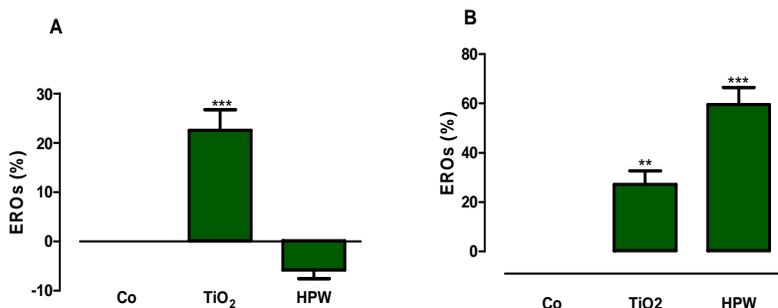


Figura 23 - Efeito das nanopartículas de TiO₂ e do HPW na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). A geração de EROs foi determinada através da sonda DCFH-DA, conforme descrito nos métodos. As células foram incubadas com 500 µg/mL das nanopartículas e 1000 µg/mL de HPW, por 24 h. Os resultados são expressos como o percentual de fluorescência em comparação com as células sem tratamento. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

A mitocôndria exerce um papel crucial no controle do processo de morte celular, além da manutenção do status bioenergético das células (SZABO; BALOG; MARK et al. 2011). Após a constatação do aumento da geração de EROs frente à incubação com as nanopartículas de TiO₂, buscou-se analisar a relação entre este aumento e a função exercida pelas mitocôndrias. Autores como Onuma e colaboradores (2009) acreditam que alguns efeitos celulares observados durante a

exposição às nanopartículas de TiO_2 são gerados a partir de mudanças nas mitocôndrias. Por exemplo, a aquisição do fenótipo tumorigênico induzido por nanopartículas de TiO_2 poderia vir de mudanças no metabolismo celular, tais como uma diminuição da síntese de ATP e do consumo de oxigênio (ONUMA; SATO; OGAWARA et al. 2009). O efeito das nanopartículas de TiO_2 sobre a função mitocondrial também foi analisada por Freyre-Fonseca e colaboradores (2011), sendo evidente a disfunção mitocondrial pela diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Usando mitocôndria isolada de pulmão de ratos wistar, os autores verificaram que nanopartículas de TiO_2 prejudicam claramente a fosforilação oxidativa e o consumo de ADP pelas células (FREYRE-FONSECA; DELGADO-BUENROSTRO; GUTIÉRREZ-CIRLOS et al. 2011). O comprometimento da função mitocondrial por nanopartículas pode ter consequências drásticas, perturbando o equilíbrio e as funções celulares (TEODORO; SIMÕES; DUARTE et al. 2011). Sendo assim, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial das células após tratamento com as nanopartículas de TiO_2 , e após 24 h de tratamento estas não parecem interferir no potencial de membrana mitocondrial em ambas as linhagens (Fig. 24).

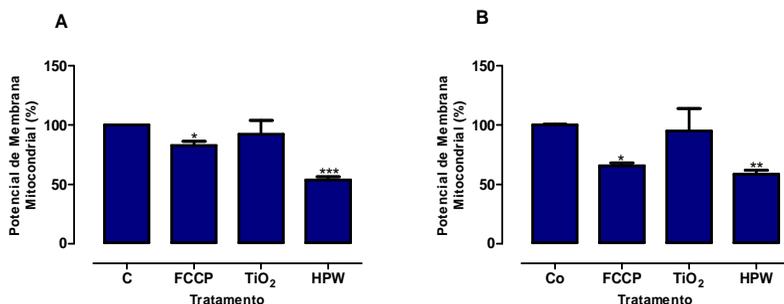


Figura 24 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW no potencial de membrana mitocondrial em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). O potencial de membrana mitocondrial foi determinado através da sonda JC-1, conforme descrito nos métodos. As células foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das nanopartículas e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HPW, por 24 h. Os resultados são expressos como o percentual de fluorescência em comparação com as células sem tratamento. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente

significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Já o HPW parece diminuir o potencial de membrana mitocondrial após 24 h de tratamento em ambas as linhagens.

No sentido de confirmar os resultados encontrados nos ensaios de viabilidade com as nanopartículas de TiO_2 , além de buscar compreender o mecanismo pelo qual as nanopartículas estariam estimulando o crescimento das células, buscou-se determinar a quantidade de DNA encontrada nas células após tratamento com as nanopartículas, além de analisar o ciclo celular. A determinação da quantidade de DNA das células mostrou que apesar das nanopartículas de TiO_2 aparentemente aumentarem a viabilidade das células nos ensaios de viabilidade celular, este resultado não se confirma, pois, observa-se que não há uma elevação do conteúdo de DNA nas amostras tratadas com estas nanopartículas (Fig. 25).

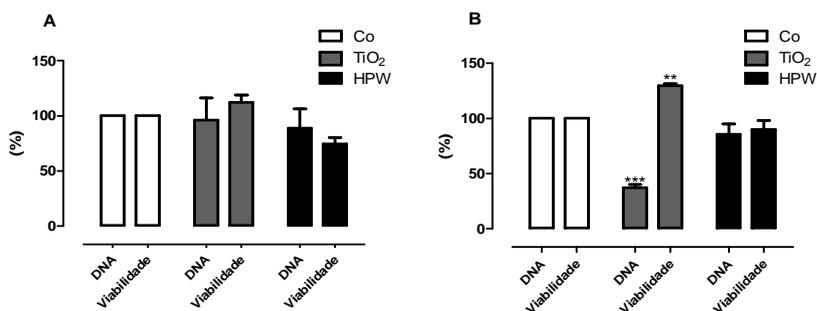


Figura 25 - Efeito das nanopartículas de TiO_2 e do HPW na quantidade de DNA x viabilidade, em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). A quantidade de DNA foi determinada espectrofotometricamente e a viabilidade através do ensaio do MTT, conforme descrito nos métodos. As células foram incubadas com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das nanopartículas e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HPW, por 24 h. Os resultados são expressos como o percentual de DNA em comparação com as células sem tratamento. Os valores de ** $p>0,01$ e *** $p<0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.

Ao contrário, na linhagem MDCK há uma diminuição na quantidade de DNA após o tempo de incubação de 24 h. Para o HPW não houve diferença significativa na viabilidade e quantidade de DNA quando comparados com o controle.

Através da análise do ciclo celular, é possível perceber que a nanopartícula de TiO_2 parece interferir no ciclo celular, bloqueando a fase S e G0/G1 do ciclo, seguido do aumento no número de células na fase Sub/G1, apenas para linhagem celular Vero (Fig 26). As nanopartículas de TiO_2 parecem bloquear também a fase S do ciclo celular para linhagem MDCK (Fig. 27). As denominações G0/G1, G2/M e S indicam as fases em que as células se encontram, e o conteúdo de DNA na fase Sub/G1 se refere à proporção de células em apoptose (ORMEROD 2002; YANG; WU; ZHANG et al. 2007). As células não tratadas mostraram uma distribuição típica nas fases G0/G1, G2/M e S. O HPW parece bloquear a fase S do ciclo celular para linhagem celular Vero (Fig.26).

As nanopartículas de TiO_2 parecem interferir com os métodos de viabilidade celular utilizados neste trabalho, sendo encontrado um aumento expressivo na viabilidade das células tratadas com esta nanopartícula, o que não se confirma na quantificação de DNA, além da análise do ciclo celular. Nestes ensaios, além da quantidade de DNA diminuir após o tratamento com as nanopartículas, houve um aumento do número de células Vero na fase Sub/G1 do ciclo celular, o que caracteriza morte celular por apoptose (ORMEROD 2002; YANG; WU; ZHANG et al. 2007).

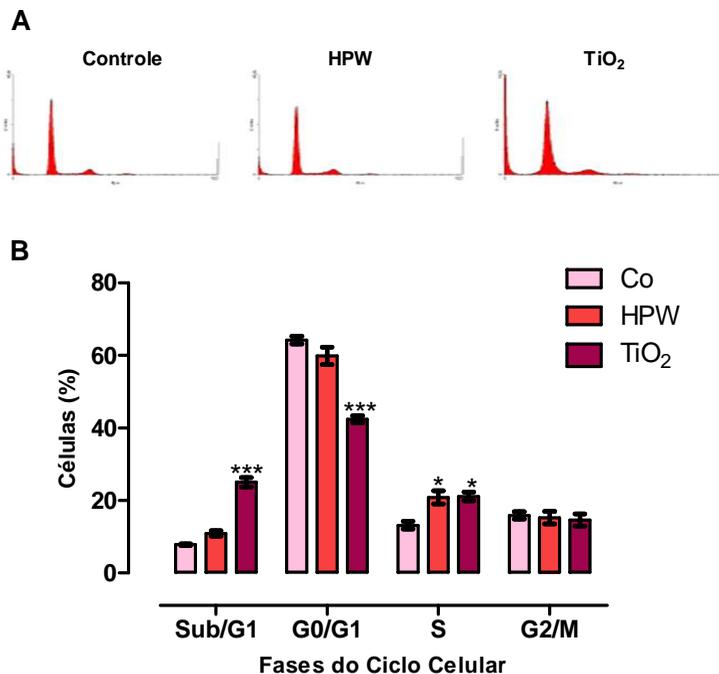


Figura 26 - Efeito das nanopartículas de TiO₂ e do HPW sobre a distribuição das células Vero no ciclo celular. (A) Histogramas mostram as células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com as substâncias. (B) As células foram tratadas com 500 µg/mL das nanopartículas de TiO₂ e com 1000 µg/mL do HPW, por 24 h e analisados por citometria de fluxo. Cada fase foi calculada usando o programa WinMDI 2.9. Os valores de * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett. A análise estatística foi feita separadamente, comparando o controle de cada fase com seus respectivos tratamentos.

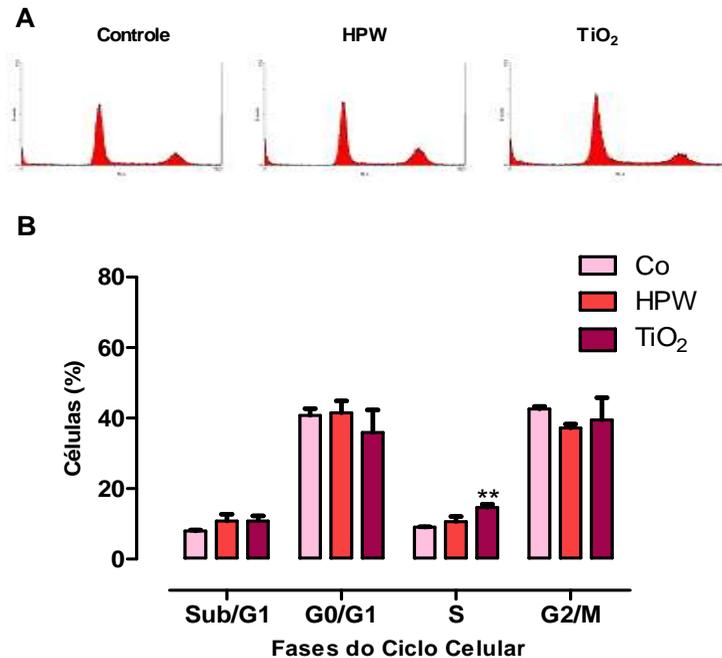


Figura 27 - Efeito das nanopartículas de TiO₂ e do HPW sobre a distribuição das células MDCK no ciclo celular. (A) Histogramas mostram as células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com as substâncias. (B) As células foram tratadas com 500 µg/mL das nanopartículas de TiO₂ e com 1000 µg/mL do HPW, por 24 h e analisados por citometria de fluxo. Cada fase foi calculada usando o programa WinMDI 2.9. O valor de **p<0,01 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett. A análise estatística foi feita separadamente, comparando o controle de cada fase com seus respectivos tratamentos.

Entretanto, apesar de termos detectado alguma citotoxicidade para as nanopartículas de TiO₂ e para o HPW, deve-se considerar que utilizamos altas concentrações dos mesmos. Sha e colaboradores avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de TiO₂ em quatro

linhagens celulares diferentes, entre elas linhagens tumorais e não tumorais, e encontraram uma citotoxicidade para ambas as linhagens com concentrações a partir de 0,1 µg/mL (SHA; GAO; WANG et al.). Liu e colaboradores (2010), mostraram que concentrações a partir de 10 µg/mL de nanopartículas diminuíram significativamente a viabilidade celular em 24 h de tratamento (LIU; XU; ZHANG et al. 2010). Para as nanopartículas e o HPW aqui estudados, concentrações abaixo de 100 µg/mL não apresentaram efeito citotóxico para as linhagens avaliadas.

Esta diferença na capacidade citotóxica das nanopartículas de TiO₂ aqui estudadas pode estar relacionada com sua composição química, uma vez que diferentes estruturas cristalinas de anatase e rutilo podem produzir diferentes respostas toxicológicas em que a fase anatase têm mostrado maior capacidade citotóxica, além de gerar um maior estresse oxidativo nas células (JIN; ZHU; WANG et al. 2008; WU; SUN e XUE 2010). Vale lembrar que apesar de sabermos que as nanopartículas de TiO₂ aqui testadas foram uma mistura de anatase e rutila, a proporção de cada uma delas na suspensão final não foi determinada, sendo que uma maior quantidade de TiO₂ na forma rutila poderia ser responsável pela menor citotoxicidade aqui encontrada, quando comparado com outros trabalhos já publicados.

Além da diferença na composição química, Wu e colaboradores (2010) também atribuem a diferença na citotoxicidade gerada por nanopartículas de TiO₂ devido a diferença no tamanho destas nanopartículas. Baggs e colaboradores (1997), através de um estudo *in vivo* com ratos, demonstraram que nanopartículas com tamanho em torno de 20 nm tem a capacidade de gerar uma resposta inflamatória pulmonar maior do que as nanopartículas com tamanho de 250 nm (BAGGS; FERIN e OBERDÖRSTER 1997).

Dessa forma, evidencia-se a necessidade de utilizar mais de um ensaio de viabilidade celular, bem como mais de uma linhagem celular, pois as nanopartículas podem exercer toxicidade por diferentes mecanismos. Utilizando-se somente um modelo, corre-se o risco de não caracterizar adequadamente uma formulação como citotóxica.

5.2.2.2 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Os parâmetros utilizados para avaliação da toxicidade *in vivo* das nanopartículas de TiO₂ foram os mesmos parâmetros utilizados para avaliação da toxicidade das nanopartículas lipídicas e poliméricas.

A avaliação da toxicidade iniciou com a pesagem dos animais após o tratamento com as nanopartículas de TiO₂, como descrito na Tabela 8, e foi possível verificar que houve uma menor variação no peso dos animais tratados com a nanopartícula de TiO₂ quando comparados com os animais do grupo controle.

Tabela 8 Variação do peso corpóreo após tratamento com as nanopartículas

Parâmetros	Controle	TiO ₂
Variação peso (g)	3,5 ± 0,5	1,16 ± 0,99*

Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Muitos trabalhos tem sido desenvolvidos no intuito de elucidar os possíveis efeitos de nanopartículas metálicas *in vitro* e *in vivo*. Isto é devido principalmente ao rápido aumento na produção desses materiais, alimentada pela necessidade crescente de se entender suas propriedades. A toxicidade das partículas vem sendo estudado ao longo de alguns anos, particularmente em lesão pulmonar, no caso de nanopartículas metálicas, partículas ambientais ultrafinas, fibras de amianto e partículas de poeira (LI; XIA e NEL 2008). Gonçalves e colaboradores (2011) fizeram uma importante observação ao estabelecer claramente que nanopartículas de TiO₂ desempenham uma atividade pró-inflamatória *in vivo*, através de modelo de inflamação aguda em murino, atraindo células como os leucócitos mono e polimorfonucleares. Esta observação é interessante, pois demonstra a atividade pró-inflamatória das nanopartículas de TiO₂ que previamente foram relatados apenas em

relação à inflamação pulmonar (GONÇALVES 2011). Xie e colaboradores (2011), em um artigo que trata da distribuição e excreção de nanopartículas de TiO_2 administradas através de injeção intravenosa em camundongos, demonstraram acúmulo das nanopartículas em órgãos como fígado, baço e pulmão (XIE; WANG; SUN et al.)

Neste trabalho, avaliando os animais após serem sacrificados, foi possível observar um acúmulo das nanopartículas de TiO_2 em toda a cavidade peritoneal, ficando mais visível principalmente próximo ao fígado e estômago, como mostrado na Figura 28.



Figura 28 - Acúmulo de nanopartículas de TiO_2 próximo ao fígado e estômago.

Estes resultados, assim como a menor variação no peso dos animais tratados com as nanopartículas de TiO_2 , está de acordo com os resultados encontrados por Chen e colaboradores (2009). Em um estudo com camundongos tratados com nanopartículas de TiO_2 via intraperitoneal, os pesquisadores também encontraram um acúmulo das nanopartículas na cavidade peritoneal dos animais, especialmente próximo ao intestino e fígado. Os autores atribuem a morte de alguns

animais a este acúmulo de nanopartículas (CHEN; DONG; ZHAO et al. 2009).

Os órgãos dos animais também foram pesados separadamente, conforme mostrado na Tabela 9, e como pode ser verificado, houve diferença significativa no peso do baço e rins dos animais tratados com as nanopartículas de TiO_2 , com aumento no peso do baço e diminuição no peso dos rins. O aumento do baço, chamado de esplenomegalia, poderia explicar as alterações causadas pelas nanopartículas em alguns parâmetros hematológicos como diminuição significativa no número total de hemácias, VCM, HCM, hemoglobina, hematócrito, leucócitos mononucleares e aumento no número de basófilos (Tabela 10), já que o baço desempenha um papel fundamental na hematopoiese, participando nos processos de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue (LLOYD e STRICKLAND 2010). A diminuição nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos encontrado nos animais tratados com as nanopartículas de TiO_2 (Tabela 11) pode estar relacionado com o aumento do baço destes animais, uma vez que mudanças nestes parâmetros podem causar danos a este órgão (FENG; LIU; BHAKOO et al.).

Tabela 9- Peso dos órgãos

Parâmetros	Controle	TiO_2
Baço	0,182 ± 0,012	0,285 ± 0,008*
Cérebro	0,374 ± 0,021	0,365 ± 0,009
Estômago	0,373 ± 0,008	0,357 ± 0,027
Pulmão	0,254 ± 0,019	0,264 ± 0,011
Fígado	2,052 ± 0,139	2,149 ± 0,061
Coração	0,207 ± 0,023	0,186 ± 0,011
Rins	0,252 ± 0,021	0,211 ± 0,011*

Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Tabela 10 - Parâmetros hematológicos dos animais controles e tratados.

Parâmetros	Controle	TiO₂
Hemácias (/mm ³)	5.937.000 ± 457	4.833.000 ± 255*
Leucócito (/mm ³)	7.691 ± 689	3.758 ± 236
VCM (fL)	71 ± 3	66 ± 2*
HCM (pg)	23 ± 3	20 ± 1*
CHCM (%)	31 ± 2	31 ± 1
Hemoglobina (g/dL)	14 ± 2	10 ± 2*
Hematócrito (%)	43 ± 2	32 ± 3*
Neutrófilo (%)	14,51 ± 2,13	17 ± 2
Mononuclear (%)	85,66 ± 3,07	74 ± 2*
Eosinófilo (%)	1 ± 1	1 ± 1
Basófilo (%)	2,5 ± 1	9 ± 1*

Abreviaturas: VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular). Valor de *p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Outro parâmetro que sofreu alteração após tratamento com as nanopartículas de TiO₂ foram os níveis séricos da enzima AST (Tabela 11). Patra e colaboradores (2009) encontraram um aumento nas enzimas AST e ALT em ratos tratados com nanopartículas inorgânicas (PATRA; ABDEL MONEIM; WANG et al. 2009), assim como Wang e colaboradores (2007), que após tratamento oral de camundongos com nanopartículas de TiO₂ com em média 80 nm, observaram a deposição destas nanopartículas no fígado, levando a dano hepático (WANG;

ZHOU; CHEN et al. 2007; PATRA; ABDEL MONEIM; WANG et al. 2009). Para estes autores, as enzimas AST e ALT são considerados os principais marcadores de dano hepático.

A albumina é a principal proteína produzida pelo fígado no corpo humano, e níveis elevados desta proteína são considerados também um indicativo de distúrbios no fígado, além de obstrução dos canais biliares (PATRA; ABDEL MONEIM; WANG et al. 2009). O tratamento com as nanopartículas de TiO₂ não levaram a alterações nos níveis séricos desta proteína. Apesar disso, o aumento na enzima AST por conta desta nanopartícula pode ser um indicativo de dano hepático.

Tabela 11 - Parâmetros bioquímicos dos animais controles e tratados

Parâmetros	Controle	TiO ₂
ALT (UI/L)	111 ± 9	119 ± 9,2
AST (UI/L)	101 ± 10	140 ± 7,19*
Albumina (g/dl)	2,30 ± 0,05	2,30 ± 0,077
Proteínas totais (g/dL)	5,07 ± 0,19	5,2 ± 0,347
Uréia (mg/dL)	62 ± 5	47 ± 2,23
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,08	0,47 ± 0,013
Triglicerídeos (mg/dl)	97 ± 19	48 ± 5,75*
Colesterol Total (mg/dl)	91 ± 12	76 ± 7,55*

Abreviaturas: ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Valor de * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Dessa forma, foi demonstrado *in vivo* que nanopartículas de TiO₂ causam alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, que caracterizam dano hepático, além de esplenomegalia. A avaliação histológica dos órgãos dos animais tratados com estas nanopartículas é uma importante ferramenta para avaliar os danos causados pela

nanopartículas (CHEN; DONG; ZHAO et al. 2009), o que ficará como perspectiva de ensaios futuros.

Como aspecto geral, pode concluir através deste trabalho que há necessidade de utilizar diferentes métodos para analisar a citotoxicidade de sistemas nanoestruturados, uma vez que as nanopartículas podem interferir nos métodos de avaliação, além dos diferentes mecanismos que podem estar relacionados a este efeito tóxico. Observamos ainda a necessidade de se usar diferentes linhagens celulares, devido às características intrínsecas de cada linhagem, o que pode representar respostas distintas frente ao mesmo material, resultando em interpretações equivocadas. Adicionalmente, os estudos de toxicidade *in vivo* permitem, embora realizados em modelo animal, obter evidências de segurança ou toxicidade a respeito destas estruturas, sendo uma importante ferramenta para garantir o uso destes materiais nas mais diversas áreas sem prejudicar a saúde e o meio ambiente.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- A avaliação da toxicidade dependente da concentração das nanopartículas lipídicas e poliméricas que demonstraram citotoxicidade nos permite concluir que, apesar das nanopartículas F1 e F4 serem citotóxicas para linhagem celular Vero, as mesmas demonstraram alto valor de IC₅₀. A nanopartícula F5 apresentou maior citotoxicidade para as células Vero, com IC₅₀ relativamente menor;

- Todas as nanopartículas, exceto F1 na linhagem celular MDCK, induziram o estresse oxidativo *in vitro*, e somente as nanopartículas F4 e F5 induziram a perda do potencial de membrana mitocondrial nas linhagens Vero e MDCK, respectivamente;

- Através da citometria de fluxo foi possível prever o tipo de morte celular gerada pelas nanopartículas F5, uma vez que o cultivo das células com a nanopartícula F5 aumentou a população de células na fase Sub/G1, sendo que o conteúdo de DNA na fase Sub/G1 se refere à proporção de células em apoptose;

- A citotoxicidade *in vitro* da nanopartícula F5 parece estar relacionada com o uso do tensoativo SDS na preparação desta nanopartícula, uma vez esta nanopartícula demonstrou maior citotoxicidade que as demais, quando comparado o valor da IC₅₀.

- As nanopartículas lipídicas e poliméricas estudadas mostraram-se biocompatíveis se usadas em baixas concentrações, uma vez que apenas algumas delas mostraram uma baixa toxicidade, com alto valor de IC₅₀.

- Na avaliação da toxicidade *in vivo* foi possível verificar que, ao contrário dos resultados *in vitro*, a nanopartícula F5 não demonstrou toxicidade para os animais, pelo menos no que diz respeito aos parâmetros hematológico e bioquímico. Já as nanopartículas F3 e F9 demonstraram toxicidade renal e hepática, respectivamente, através de parâmetros bioquímicos que são usados para identificar tais alterações.

- Através dos ensaios de viabilidade *in vitro* MTT e vermelho neutro, as nanopartículas de TiO₂ não parecem ser citotóxica para as

linhagens celulares testadas, mas ao contrário, os resultados sugerem um aumento na viabilidade celular, em ambas as linhagens e para ambos os ensaios; já o HPW mostrou-se citotóxico em ambos os ensaios de viabilidade, para ambas as linhagens de células;

- Através da avaliação da quantidade de DNA e do ciclo celular das células tratadas com as nanopartículas de TiO_2 foi possível perceber que a nanopartícula de TiO_2 parece interagir com os ensaios de viabilidade, uma vez que não houve aumento na quantidade de DNA das células tratadas com essa nanopartícula, como era esperado. Além disso, através da análise do ciclo celular, foi possível perceber um aumento no número de células na fase Sub/G1, o que corresponde à proporção de células mortas por apoptose. Contrariando os resultados encontrados nos ensaios de viabilidade. Para o HPW não houve diferença significativa na viabilidade e quantidade de DNA quando comparados com o controle.

- Na avaliação da toxicidade das nanopartículas de TiO_2 *in vivo*, foi possível perceber macroscopicamente após os animais serem sacrificados, um acúmulo das nanopartículas de TiO_2 em toda a cavidade peritoneal, podendo este acúmulo estar relacionado com o menor ganho de peso dos animais tratados quando comparados com o grupo controle;

- Através da avaliação da toxicidade *in vivo* das nanopartículas de TiO_2 demonstramos que essas nanopartículas causam alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, o que caracterizam dano ao baço e ao fígado, inclusive com aumento do tamanho do baço.

7. Perspectivas

A fim de dar continuidade a este trabalho, temos como perspectivas:

- Avaliar a toxicidade de nanopartículas de TiO_2 com HPW adsorvido e que possuem potencial perspectiva de utilização como catalisador na fotocatalise heterogênea, na descontaminação ambiental microbiológica e de produtos químicos;
- Avaliar os cortes histológicos dos órgãos dos animais tratados com as nanopartículas F3, F5, F9 e de TiO_2 com o intuito de melhor caracterizar a toxicidade destas nanopartículas *in vivo*;
- Dar continuidade ao estudo de toxicidade das nanopartículas lipídicas e poliméricas através da avaliação dos mecanismos moleculares de toxicidade destas substâncias;
- Sintetizar nanopartículas adsorvidas com substância fluorescente para a avaliação da endocitose através de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo;

8. Referências

AHAMED, M. **Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells.** *Toxicol In Vitro.* (2011),

ALLEN, T. M. e MARTIN, F. J. **Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines.** *Seminars in Oncology.* (2004), 31 (Supplement 13), 5-15.

BAGGS, R. B.; FERIN, J. e OBERDÖRSTER, G. **Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats.** *Vet Pathol.* (1997), 34 (6), 592-597.

BARRENA, R.; CASALS, E.; COLÓN, J.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A. e PUNTES, V. **Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles.** *Chemosphere.* (2009), 75 (7), 850-857.

BERNARDI, P. **Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition.** *Physiol Rev.* (1999), 79 (4), 1127-1155.

BOREK, F. **Culture of animal cells: A manual of basic technique : Freshney, R.I., 3rd edn., 496 pp., Wiley-Liss, New York, 1993. USD 69.95, ISBN 0-471-58966-7.** *Journal of Immunological Methods.* (1995), 183 (2), 291-291.

BOUAZIZ, C.; ABID-ESSEFI, S.; BOUSLIMI, A.; EL GOLLI, E. e BACHA, H. **Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells.** *Toxicon.* (2006), 48 (3), 343-352.

BRAYDICH-STOLLE, L.; HUSSAIN, S.; SCHLAGER, J. J. e HOFMANN, M. C. **In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells.** *Toxicol Sci.* (2005), 88 (2), 412-419.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C. e COUVREUR, P. **Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis.** *Adv Drug Deliv Rev.* (2002), 54 (5), 631-651.

CAON, T.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; LEMOS-SENNA, E.; CLOUTET, E.; CRAMAIL, H.; BORSALI, R.; SOLDI, V. e OLIVEIRA SIMÕES, M. C. **Evaluation of DNA damage and cytotoxicity of polyurethane-**

based nano- and microparticles as promising biomaterials for drug delivery systems.Journal of Nanoparticle Research. (2010), 12, 10.

CHATTOPADHYAY, P.;SHEKUNOV, B. Y.;YIM, D.;CIPOLLA, D.;BOYD, B. e FARR, S.**Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system.**Adv Drug Deliv Rev. (2007), 59 (6), 444-453.

CHEN, J.;DONG, X.;ZHAO, J. e TANG, G.**In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection.**J Appl Toxicol. (2009), 29 (4), 330-337.

CHEN, Z.;MENG, H.;XING, G.;CHEN, C.;ZHAO, Y.;JIA, G.;WANG, T.;YUAN, H.;YE, C.;ZHAO, F.;CHAI, Z.;ZHU, C.;FANG, X.;MA, B. e WAN, L.**Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo.**Toxicology Letters. (2006), 163 (2), 109-120.

COLLINS, I. e GARRETT, M. D.**Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors.**Curr Opin Pharmacol. (2005), 5 (4), 366-373.

CORMODE, D. P.;JARZYNA, P. A.;MULDER, W. J. M. e FAYAD, Z. A.**Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging.**Advanced Drug Delivery Reviews. (2010), 62 (3), 329-338.

DAUGHTON, C. G. e TERNES, T. A.**Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?**Environ Health Perspect. (1999), 107 Suppl 6, 907-938.

DE BERARDIS, B.;CIVITELLI, G.;CONDELLO, M.;LISTA, P.;POZZI, R.;ARANCIA, G. e MESCHINI, S.**Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells.**Toxicol Appl Pharmacol. (2010),

DE MELO, C. P. e PIMENTA, M.**Nanociência e Nanotecnologia.**Parcerias Estratégicas. (2004), 18, 13.

DHAWAN, A. e SHARMA, V.**Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges.**Anal Bioanal Chem. (2010), 398 (2), 589-605.

DIAS, E.; ANDRADE, M.; ALVERCA, E.; PEREIRA, P.; BATORÉU, M. C.; JORDAN, P. e SILVA, M. J. **Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line.** *Toxicon*. (2009), 53 (5), 487-495.

DROBNE, D.; JEMEC, A. e PIPAN TKALEC, Z. **In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO₂.** *Environmental Pollution*. (2009), 157 (4), 1157-1164.

EOM, H.-J. e CHOI, J. **Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B.** *Toxicology in Vitro*. (2009), 23 (7), 1326-1332.

ESTEVEZ, A. C. C.; TIMMONS, A. B. e TRINDADE, T. **Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos.** *Química Nova*. (2004), 27, 8.

FADEEL, B. e GARCIA-BENNETT, A. E. **Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications.** *Adv Drug Deliv Rev*. (2010), 62 (3), 362-374.

FARAJI, A. H. e WIPF, P. **Nanoparticles in cellular drug delivery.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2009), 17 (8), 2950-2962.

FENG, J.; LIU, H.; BHAKOO, K. K.; LU, L. e CHEN, Z. **A metabonomic analysis of organ specific response to USPIO administration.** *Biomaterials*. In Press, Corrected Proof,

FERRARI, M. **Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.** *Nat Rev Cancer*. (2005), 5 (3), 161-171.

FOLEY, S.; CROWLEY, C.; SMAIHI, M.; BONFILS, C.; ERLANGER, B. F.; SETA, P. e LARROQUE, C. **Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2002), 294 (1), 116-119.

FOUCAUD, L.; GOULAOUIC, S.; BENNASROUNE, A.; LAVALGILLY, P.; BROWN, D.; STONE, V. e FALLA, J. **Oxidative stress induction by nanoparticles in THP-1 cells with 4-HNE production:**

stress biomarker or oxidative stress signalling molecule? *Toxicol In Vitro.* (2010), 24 (6), 1512-1520.

FREYRE-FONSECA, V.; DELGADO-BUENROSTRO, N. L.; GUTIÉRREZ-CIRLOS, E. B.; CALDERÓN-TORRES, C. M.; CABELLOS-AVELAR, T.; SÁNCHEZ-PÉREZ, Y.; PINZÓN, E.; TORRES, I.; MOLINA-JIJÓN, E.; ZAZUETA, C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; GARCÍA-CUÉLLAR, C. M. e CHIRINO, Y.
I. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol Lett.* (2011), 202 (2), 111-119.

GARCIA, M. B. F. **Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas.** Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. (2010) Doutorado: 154.

GHALY, M. Y.; JAMIL, T. S.; EL-SEESY, I. E.; SOUAYA, E. R. e NASR, R. A. **Treatment of highly polluted paper mill wastewater by solar photocatalytic oxidation with synthesized nano TiO₂.** *Chemical Engineering Journal.* (2011), 168 (1), 446-454.

GOGATE, P. R. e PANDIT, A. B. **A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions.** *Advances in Environmental Research.* (2004), 8 (3-4), 501-551.

GONÇALVES, D. M.; CHIASSON, S. e GIRARD, D. **Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles.** *Toxicology in Vitro.* (2010), 24 (3), 1002-1008.

GONÇALVES, L. P. **Nanopartículas de dióxido de titânio como aditivos em materiais híbridos orgânico-inorgânico fotocromicos baseados em fosforotungstos.** Instituto de Química de São Carlos. São Paulo, Universidade de São Paulo. (2011) Mestrado: 137.

GRASSIAN, V. H.; O'SHAUGHNESSY, P. T.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; PETTIBONE, J. M. e THORNE, P. S. **Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm.** *Environ Health Perspect.* (2007), 115 (3), 397-402.

GRIVICICH, I.;REGNER, A. e ROCHA, A. B.**Morte Celular por Apoptose**.Revista Brasileira de Cancerologia. (2007), 53, 8.

GRTB.**Culture of animal cells: A manual of basic technique. 2nd edition : Ian R Freshney. Alan R Liss, Inc. N.Y. 396pp. Cost \$59.50**.Cell Biology International Reports. (1990), 14 (1), 89-89.

HAN, R.**Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Tecniques**.Pekin Medical University Pekin Union Medical College joint Publishing House, Beijing. (1997), 395-399.

HIURA, T. S.;LI, N.;KAPLAN, R.;HORWITZ, M.;SEAGRAVE, J. C. e NEL, A. E.**The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles**.J Immunol. (2000), 165 (5), 2703-2711.

HSIAO, I. L. e HUANG, Y. J.**Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells**.Sci Total Environ. (2011), 409 (7), 1219-1228.

HU, X.;COOK, S.;WANG, P. e HWANG, H. M.**In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles**.Sci Total Environ. (2009), 407 (8), 3070-3072.

HUANG, S.;CHUEH, P. J.;LIN, Y. W.;SHIH, T. S. e CHUANG, S. M.**Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure**.Toxicol Appl Pharmacol. (2009), 241 (2), 182-194.

HUSSAIN, S.;BOLAND, S.;BAEZA-SQUIBAN, A.;HAMEL, R.;THOMASSEN, L. C. J.;MARTENS, J. A.;BILLON-GALLAND, M. A.;FLEURY-FEITH, J.;MOISAN, F.;PAIRON, J.-C. e MARANO, F.**Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount**.Toxicology. (2009), 260 (1-3), 142-149.

HUSSAIN, S.;THOMASSEN, L. C.;FERECATU, I.;BOROT, M. C.;ANDREAU, K.;MARTENS, J. A.;FLEURY, J.;BAEZA-SQUIBAN, A.;MARANO, F. e BOLAND, S.**Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells**.Part Fibre Toxicol. (2010), 7, 10.

INOVAÇÃO, R. **Nanotecnologia**. Knowledge Center. (2005), 44.

JIN, C.-Y.; ZHU, B.-S.; WANG, X.-F. e LU, Q.-H. **Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells**. Chemical Research in Toxicology. (2008), 21 (9), 1871-1877.

JONES, C. F. e GRAINGER, D. W. **In vitro assessments of nanomaterial toxicity**. Adv Drug Deliv Rev. (2009), 61 (6), 438-456.

JOSHI, M. D. e MÜLLER, R. H. **Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives**. Eur J Pharm Biopharm. (2009), 71 (2), 161-172.

KIM, S.; CHOI, J. E.; CHOI, J.; CHUNG, K.-H.; PARK, K.; YI, J. e RYU, D.-Y. **Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells**. Toxicology in Vitro. (2009), 23 (6), 1076-1084.

KWON, S. M.; NAM, H. Y.; NAM, T.; PARK, K.; LEE, S.; KIM, K.; KWON, I. C.; KIM, J.; KANG, D.; PARK, J. H. e JEONG, S. Y. **In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier**. J Control Release. (2008), 128 (1), 89-97.

LASAGNA-REEVES, C.; GONZALEZ-ROMERO, D.; BARRIA, M. A.; OLMEDO, I.; CLOS, A.; SADAGOPA RAMANUJAM, V. M.; URAYAMA, A.; VERGARA, L.; KOGAN, M. J. e SOTO, C. **Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice**. Biochem Biophys Res Commun. (2010), 393 (4), 649-655.

LI, N.; SIOUTAS, C.; CHO, A.; SCHMITZ, D.; MISRA, C.; SEMPF, J.; WANG, M.; OBERLEY, T.; FROINES, J. e NEL, A. **Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage**. Environ Health Perspect. (2003), 111 (4), 455-460.

LI, N.; XIA, T. e NEL, A. E. **The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles**. Free Radical Biology and Medicine. (2008), 44 (9), 1689-1699.

LI, Y.; LI, J.; YIN, J.; LI, W.; KANG, C.; HUANG, Q. e LI, Q. **Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice**. J Nanosci Nanotechnol. (2010), 10 (12), 8544-8549.

LIU, J.;GONG, T.;FU, H.;WANG, C.;WANG, X.;CHEN, Q.;ZHANG, Q.;HE, Q. e ZHANG, Z.**Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin.**Int J Pharm. (2008), 356 (1-2), 333-344.

LIU, R.;YIN, L.;PU, Y.;LIANG, G.;ZHANG, J.;SU, Y.;XIAO, Z. e YE, B.**Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats.**Progress in Natural Science. (2009), 19 (5), 573-579.

LIU, S.;XU, L.;ZHANG, T.;REN, G. e YANG, Z.**Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells.**Toxicology. (2010), 267 (1-3), 172-177.

LIU, W.-T.**Nanoparticles and their biological and environmental applications.**Journal of Bioscience and Bioengineering. (2006), 102 (1), 1-7.

LIU, Y.;LIU, R.;LIU, C.;LUO, S.;YANG, L.;SUI, F.;TENG, Y.;YANG, R. e CAI, Q.**Enhanced photocatalysis on TiO₂ nanotube arrays modified with molecularly imprinted TiO₂ thin film.**Journal of Hazardous Materials. (2010), 182 (1-3), 912-918.

LLOYD, D. M. e STRICKLAND, A. D.**Surgery of the spleen.**Surgery (Oxford). (2010), 28 (5), 229-233.

MADDIKA, S.;ANDE, S. R.;PANIGRAHI, S.;PARANJOTHY, T.;WEGLARCZYK, K.;ZUSE, A.;ESHRAHGI, M.;MANDA, K. D.;WIECHEC, E. e LOS, M.**Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy.**Drug Resist Updat. (2007), 10 (1-2), 13-29.

MENARD, A.;DROBNE, D. e JEMEC, A.**Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data.**Environ Pollut. (2011), 159 (3), 677-684.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.;INMAN, A. O. e ZHANG, L. W.**Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line.**Toxicology and Applied Pharmacology. (2009), 234 (2), 222-235.

MOORE, M. N.**Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?**Environment International. (2006), 32 (8), 967-976.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J Immunol Methods. (1983), 65 (1-2), 55-63.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S.; RAVELLI, V.; MEHNERT, W.; THÜNEMANN, A. F. e SOUTO, E. B. **Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals.** Int J Pharm. (2006), 317 (1), 82-89.

NASSIMI, M.; SCHLEH, C.; LAUENSTEIN, H. D.; HUSSEIN, R.; HOYMAN, H. G.; KOCH, W.; POHLMANN, G.; KRUG, N.; SEWALD, K.; RITTINGHAUSEN, S.; BRAUN, A. e MÜLLER-GOYMANN, C. **A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. (2010), 75 (2), 107-116.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L. e LI, N. **Toxic potential of materials at the nanolevel.** Science. (2006), 311 (5761), 622-627.

NOGUEIRA, R. F. P. e JARDIM, W. F. A **Fotocatálise heterogênea e sua aplicação ambiental.** Química Nova. (1998), 21, 4.

NOHYNEK, G. J. e DUFOUR, E. **Nanotechnology in cosmetics and sunscreens: is there a health risk??** Congrès de la SFT, Paris. (2008).

OLLIS, D. F. **Photocatalytic purification and remediation of contaminated air and water.** Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry. (2000), 3 (6), 405-411.

ONUMA, K.; SATO, Y.; OGAWARA, S.; SHIRASAWA, N.; KOBAYASHI, M.; YOSHITAKE, J.; YOSHIMURA, T.; IIGO, M.; FUJII, J. e OKADA, F. **Nano-Scaled Particles of Titanium Dioxide Convert Benign Mouse Fibrosarcoma Cells into Aggressive Tumor Cells.** The American Journal of Pathology. (2009), 175 (5), 2171-2183.

ORMEROD, M. G. **Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry.** Journal of Immunological Methods. (2002), 265 (1-2), 73-80.

PARDEIKE, J.;HOMMOSS, A. e MÜLLER, R. H.**Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products.**Int J Pharm. (2009), 366 (1-2), 170-184.

PARK, E. J.;YI, J.;CHUNG, K. H.;RYU, D. Y.;CHOI, J. e PARK, K.**Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells.**Toxicol Lett. (2008), 180 (3), 222-229.

PASCHOALINO, M. P.;MARCONE, G. P. S. e JARDIM, W. F.**Os Nanomateriais e a Questão Ambiental.**Química Nova. (2010), 33, 9.

PATRA, C. R.;ABDEL MONEIM, S. S.;WANG, E.;DUTTA, S.;PATRA, S.;ESHED, M.;MUKHERJEE, P.;GEDANKEN, A.;SHAH, V. H. e MUKHOPADHYAY, D.**In vivo toxicity studies of europium hydroxide nanorods in mice.**Toxicology and Applied Pharmacology. (2009), 240 (1), 88-98.

PATRA, H. K.;BANERJEE, S.;CHAUDHURI, U.;LAHIRI, P. e DASGUPTA, A. K.**Cell selective response to gold nanoparticles.**Nanomedicine. (2007), 3 (2), 111-119.

REPETTO, G.;DEL PESO, A. e ZURITA, J. L.**Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity.**Nat Protoc. (2008), 3 (7), 1125-1131.

REUTER, S.;GUPTA, S. C.;CHATURVEDI, M. M. e AGGARWAL, B. B.**Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?**Free Radic Biol Med. (2010), 49 (11), 1603-1616.

REZZANI, R.;ANGOSCINI, P.;BORSANI, E.;RODELLA, L. e BIANCHI, R.**Cyclosporine A-induced toxicity in two renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK).**Histochem J. (2002), 34 (1-2), 27-33.

SALATA, O.**Applications of nanoparticles in biology and medicine.**Journal of Nanobiotechnology. (2004), 2, 6.

SAMBROOK, J. e RUSSELL, D. W.**Molecular Cloning: a laboratory manual.**New York: Cold Spring Harbor. (2001), 3, 2.

SAUER, H.;WEFER, K.;VETRUGNO, V.;POCCHIARI, M.;GISSEL, C.;SACHINIDIS, A.;HESCHELER, J. e WARTENBERG, M.**Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- α : the role of intracellular reactive oxygen species.**Free Radic Biol Med. (2003), 35 (6), 586-594.

SHA, B.;GAO, W.;WANG, S.;XU, F. e LU, T.**Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles Differs in Four Liver Cells from Human and Rat.**Composites Part B: Engineering. In Press, Accepted Manuscript,

SHI, Y.;WANG, F.;HE, J.;YADAV, S. e WANG, H.**Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway.**Toxicology Letters. (2010), 196 (1), 21-27.

SHUKLA, R. K.;SHARMA, V.;PANDEY, A. K.;SINGH, S.;SULTANA, S. e DHAWAN, A.**ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells.**Toxicol In Vitro. (2011), 25 (1), 231-241.

SIES, H.**Oxidative stress: oxidants and antioxidants.**Experimental Physiology. (1997), 82, 4.

SINANI, V. A.;KOKTYSH, D. S.;YUN, B.-G.;MATTS, R. L.;PAPPAS, T. C.;MOTAMEDI, M.;THOMAS, S. N. e KOTOV, N. A.**Collagen Coating Promotes Biocompatibility of Semiconductor Nanoparticles in Stratified LBL Films.**Nano Letters. (2003), 3, 6.

SOUZA, L. A. G. D. e CAMARA, M. R. G. D.Tite. Retrieved 09 de maio, 2011.

SPIEKSTRA, S. W.;DOS SANTOS, G. G.;SCHEPER, R. J. e GIBBS, S.**Potential method to determine irritant potency in vitro - Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency.**Toxicol In Vitro. (2009), 23 (2), 349-355.

STERN, S. T. e MCNEIL, S. E.**Nanotechnology safety concerns revisited.**Toxicol Sci. (2008), 101 (1), 4-21.

STONE, V. e DONALDSON, K. **Nanotoxicology: signs of stress**. *Nat Nanotechnol.* (2006), 1 (1), 23-24.

STORHOFF, J. J.; MARLA, S. S.; BAO, P.; HAGENOW, S.; MEHTA, H.; LUCAS, A.; GARIMELLA, V.; PATNO, T.; BUCKINGHAM, W.; CORK, W. e MÜLLER, U. R. **Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system**. *Biosensors and Bioelectronics.* (2004), 19 (8), 875-883.

SZABO, A.; BALOG, M.; MARK, L.; MONTSKO, G.; TURI, Z.; GALLYAS, F.; SUMEGI, B.; KALAI, T.; HIDEG, K. e KOVACS, K. **Induction of mitochondrial destabilization and necrotic cell death by apolar mitochondria-directed SOD mimetics**. *Mitochondrion.* (2011),

TAVARES, A. A. D. S. e TAVARES, J. M. R. S. **Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante**. Porto/Portugal, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. (2009): 33.

TEODORO, J. S.; SIMÕES, A. M.; DUARTE, F. V.; ROLO, A. P.; MURDOCH, R. C.; HUSSAIN, S. M. e PALMEIRA, C. **Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective**. *Toxicol In Vitro.* (2011), 25 (3), 664-670.

TSUJI, J. S.; MAYNARD, A. D.; HOWARD, P. C.; JAMES, J. T.; LAM, C. W.; WARHEIT, D. B. e SANTAMARIA, A. B. **Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles**. *Toxicol Sci.* (2006), 89 (1), 42-50.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M. e FLORENTINO, A. O. **Studies on the adsorption and kinetics of photodegradation of a model compound for heterogeneous photocatalysis onto TiO₂**. *Chemosphere.* (2006), 64 (7), 1128-1133.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M. e MAZUR, M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**. *Chem Biol Interact.* (2006), 160 (1), 1-40.

VAUCHER, R. A.; TEIXEIRA, M. L. e BRANDELLI, A. **Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells.** *Curr Microbiol.* (2010), 60 (1), 1-5.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R. e BERNEMAN, Z. N. **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell Prolif.* (2003), 36 (3), 131-149.

WANG, F.; GAO, F.; LAN, M.; YUAN, H.; HUANG, Y. e LIU, J. **Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells.** *Toxicol In Vitro.* (2009), 23 (5), 808-815.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; GAO, Y.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y. e CHAI, Z. **Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration.** *Toxicology Letters.* (2007), 168 (2), 176-185.

WANG, M. e THANOU, M. **Targeting nanoparticles to cancer.** *Pharmacol Res.* (2010), 62 (2), 90-99.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y. e WU, X. Y. **Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* (2007), 59 (6), 491-504.

WU, J.; SUN, J. e XUE, Y. **Involvement of JNK and P53 activation in G2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells.** *Toxicology Letters.* (2010), 199 (3), 269-276.

XIA, T.; KORGE, P.; WEISS, J. N.; LI, N.; VENKATESEN, M. I.; SIOUTAS, C. e NEL, A. **Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity.** *Environ Health Perspect.* (2004), 112 (14), 1347-1358.

XIE, G.; WANG, C.; SUN, J. e ZHONG, G. **Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles.** *Toxicology Letters.* In Press, Corrected Proof,

- YANG, L.;WU, S.;ZHANG, Q.;LIU, F. e WU, P.**23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37).**Cancer Lett. (2007), 256 (2), 267-278.
- YUAN, H.;ZHANG, W.;DU, Y. Z. e HU, F. Q.**Ternary nanoparticles of anionic lipid nanoparticles/protamine/DNA for gene delivery.**Int J Pharm. (2010), 392 (1-2), 224-231.
- ZANETTI-RAMOS, B. G. e CRECZYNSKI-PASA, T. B.**O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos.**Revista Brasileira de Farmácia. (2008), 89 (2), 6.
- ZANETTI-RAMOS, B. G.;LEMOSENNA, E.;SOLDI, V.;BORSALI, R.;CLOUTET, E. e CRAMAIL, H.**Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique.**Polymer. (2006), 47 (24), 8080-8087.
- ZHANG, R.;NIU, Y.;LI, Y.;ZHAO, C.;SONG, B.;LI, Y. e ZHOU, Y.**Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice.**Environmental Toxicology and Pharmacology. (2010), 30 (1), 52-60.
- ZHANG, Y.;KOHLE, N. e ZHANG, M.**Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake.**Biomaterials. (2002), 23 (7), 1553-1561.
- ZHAO, M.;ANTUNES, F.;EATON, J. W. e BRUNK, U. T.**Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis.**Eur J Biochem. (2003), 270 (18), 3778-3786.
- ZHU, R. R.;WANG, S. L.;CHAO, J.;SHI, D. L.;ZHANG, R.;SUN, X. Y. e YAO, S. D.**Bio-effects of Nano-TiO₂ on DNA and cellular ultrastructure with different polymorph and size.**Materials Science and Engineering: C. (2009), 29 (3), 691-696.

9. Anexo

Manuscrito submetido à revista Science of the Total Environment.

In vitro evaluation of lipid nanoparticles biocompatibility.

Adny Henrique Silva^a, Bruno Mattei^a, Betina G. Zanetti-Ramos^b,
Tânia Beatriz Creczynski Pasa^{a*}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88050-005, Brazil; ^bNanovetores – Encapsulados de Alta Tecnologia. SC 401, km1, ParqTecAlfa, Ed. Celta, 4º andar, Florianópolis, SC, 88030-000, Brazil.

*Corresponding Author:

Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Ciências Farmacêuticas

CEP: 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil

Tel.: +55 48 3721-8057 Fax: +55 48 3721 5642

E-mail: taniac@mbox1.ufsc.br

Abstract

This study was addressed to the current deficient knowledge on cellular response to lipid nanoparticles exposure. We investigated the cytotoxicity of eight lipid nanoparticles (named F1 to F8) in two fibroblast cell lineages, Vero and MDCK. Several methods were

used to explore the mechanisms involved. Among the nanoparticles tested, two of them (F5 and F4) seem to be more cytotoxic. The viability assays used suggest that these nanoparticles interfere on cell mitochondrial metabolism and on lysosomal activity. Besides, cell cultivation with F5 increased the population of MDCK cells in G0/G1 and G2/M cell phase, which was accompanied by a marked increase of a Sub/G1 population, that suggesting death by apoptosis. The formulation F4, although shown to be cytotoxic, the IC_{50} for cell viability is very high, ~ 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for both cell lineages tested. The IC_{50} to F5 was about 247 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The reason of the higher cytotoxicity of the formulation F5 will be further studied, however we have some evidences that are the presence of SDS (sodium dodecyl sulphate) in this formulation. Basically the nanoparticles tested here are biocompatible if used at low concentrations. Further studies are required to elucidate the mechanism of action of these nanoscale structures, in order to determine the implication of their increased and widespread use.

Highlights:

We investigated the cytotoxicity of eight lipid nanoparticles in vitro. Cell culture is an alternative to explore the mechanisms involved. We used Vero and MDCK lineages. The nanoparticles tested here are biocompatible if used at low concentrations.

Key words: nanoparticles, cytotoxicity, Vero cells, MDCK cells.

1. Introduction

Nanotechnology has a large number of potential applications in many different areas and the safety of nanomaterials has become a major concern. The nanoparticles are present in commercially available products, including cosmetics, food, clothes, and military, being increasingly used in medicine for diagnostic purposes, imaging and drug delivery. Currently statistics data show that more than 1000 products or product lines available in

the market using nanotechnology in their production (Hsiao and Huang, 2011). Nanoparticles have unusual physicochemical properties, such as small size, surface area and size distribution, chemical composition, purity, crystallinity, electronic properties, surface structure, surface reactivity, surface groups, inorganic or organic coatings, solubility, shape and aggregation (Nel et al., 2006), and are precisely these properties that make nanoparticles so attractive. It is believed that the small size of nanoparticles allows them to enter and pass through the tissues, cells and organelles, and the size of some nanoparticles is similar to many biological molecules such as proteins, and microorganisms, such as viruses (Fadeel and Garcia-Bennett, 2010).

Lipid nanoparticles has been widely used in nanomedicine, e.g. in cosmetic and skin formulations (Pardeike et al., 2009), for cancer treatment (Joshi and Müller, 2009; Wang and Thanou, 2010), for lung cancer therapy (Chattopadhyay et al., 2007) per oral and ocular drug delivery (Müller et al., 2006), for gene therapy (Kwon et al., 2008) for imaging, among others.

Although, many lipid nanoparticles showed not to be cytotoxic (Liu et al., 2008); (Joshi and Müller, 2009; Yuan et al., 2010), the composition of the nanoparticles used in the formulations is not uniform and differ in nature and percentage of lipids. Due to the poor comparability of toxicity data in the literature, it is necessary to study the toxicity of lipid nanoparticles first *in vitro*, then *ex vivo*, and finally *in vivo* (Nassimi et al., 2010).

Humans have been exposed to airborne nanosized particles throughout their evolutionary stages, but exposure has increased dramatically over the last century due to anthropogenic sources. With the rapid growth and development of nanotechnology, is probably to increase exposure to these nanostructures, leading to inhalation, ingestion, injection and absorption of nanomaterials (Oberdörster et al., 2005). Due to the increase in investment and production of goods at the nanoscale combined with the increased occupational exposure of workers and consumers, it is of great importance to assess the safety of these nanomaterials (Hsiao and Huang, 2011; Hu et al., 2009).

Cell culture is an alternative way to predict the toxicity of nanoparticles and explore the mechanisms involved. Therefore, in this work we explored the effect of lipid nanoparticles in distinct

cell viability assays, in the possibility of mitochondrial potential and cell cycle disturbance, as well as in the reactive oxygen species generation (ROS).

The viability assays, as 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and Neutral Red give information about basal cytotoxicity and reflect the capacity of some compounds to cause cell death as a consequence of damage of basic cellular functions (Ivanova and Uhlig, 2008). The mitochondria is the organelle responsible for generating 80 to 90% of ATP used in respiration and cell survival (Dias and Bailly, 2005), and its function can be assessed using the MTT assay. The cell metabolism of neutral Red in its turn, furnish the information about the lysosomal activity.

Additionally, the mitochondria plays a crucial role in controlling cell death, by maintaining the bio-energetic state of cells (Szabo et al., 2011) and the mitochondrial membrane potential is crucial in this function, since any disturbance on it will change mitochondrial role in power generation and trigger the cell death mechanisms (Bernardi, 1999; Teodoro et al., 2011).

Oxidative stress occurs when generation of ROS exceed the capacity of antioxidant defense mechanism. This imbalance leads to damage of important biomolecules and cells, with potential impact on the whole organism (Ahamed, 2011). Oxidative stress has been implicated as an explanation behind nanoparticles toxicity (Ahamed, 2011; Shukla et al., 2011; Wang et al., 2009).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Several types of lipid were employed in nanoparticles preparation, such as Tristearin (Dynasan 118 – Sasol-Germany), Solid White Vaseline USP (DEG - Brazil), and vegetal lipids from *Butyrospermum Parkii*, *Theobroma cacao*, *Virola surinamensis*, *Platonia esculenta* (Naturais da Amazônia – Brazil).

The surfactants polysorbate 80 (Tween 80) and Sodium Dodecylsulfate (SDS) were purchased from Sigma-Aldrich. The cell culture media and fetal calf serum were purchased from Cultilab (São Paulo, Brazil). The antibiotics penicillin/streptomycin were purchased from GIBCO (Grand Island, NY, USA), the JC-1 probe (5,5',6'6'-tetrachloro-,1',3,3' tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) and DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) from Merck (Darmstadt, Germany), and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2 Nanoparticles preparation

Tristearin nanoparticles and Solid White Vaseline USP nanoparticles were prepared by solubilization of 200 mg of lipid in a solution of chlorophorm/methanol (1:1). Organic solvents were removed and the lipid layer was melted by heating at 5°C above of the lipid melting point.

An aqueous phase was prepared by dissolving Tween 80 or SDS (1%) in ultra-pure water (MilliQ - Millipore®) to produce 20 mL of the preparation and heated to the molten lipid phase temperature. Hot aqueous phase was added to molten lipid phase and ultrasonicated (Vibracells) for 2 minutes, 20W. The particles were obtained by allowing the hot nanoemulsion to cool to room temperature.

Particles obtained from vegetal lipids are patented and produced by Nanovetores® PI 0801545-7A2. Basically, the same technique described above was employed in nanoparticles preparation, except the use of organic solvents.

2.3. Nanoparticles characterization

The average particle size/distribution and zeta potential were determined by dynamic light scattering and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), equipped with 173° scattering

angle. The measurements were made at 25°C after appropriate dilution of the samples in distilled water. The size distribution of particles is given by the Polydispersity Index (PDI or PI). To measure the zeta potential, nanoparticles samples were placed in a specific cell where a potential of $\pm 150\text{mV}$ was established. The potential values were calculated from the mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

2.4. Cell Culture

Monkey kidney fibroblasts (Vero) and dog kidney fibroblasts (MDCK) were obtained from American Type Culture Cell (ATCC). The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin and 10 mM HEPES. The cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and pH 7.4. Every 2–3 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with fresh medium. In all experiments, viable cells were checked in the beginning of the experiment by Trypan Blue exclusion.

2.5. Viability assay

Nanoparticles cytotoxicity was evaluated by MTT (Mosmann, 1983) and neutral red assay (NR) (Repetto et al., 2008). Vero cells ($1 \times 10^4/0,2$ mL) and MDCK cells ($2 \times 10^4/0,2$ mL) were incubated for 24, at nanoparticles concentrations from 100 to 1000 $\mu\text{g/mL}$, in triplicate, in 96-well microplates. After incubation at 37 °C, cells were washed with fresh culture medium, and 5 mg/mL of MTT were added followed by incubation for 2h at 37 °C. The precipitated formazan was dissolved in 100 μL of DMSO, and the absorbance was measured at 540 nm using a micro-well system reader. To neutral red assay, after incubation, the medium containing the particles was replaced with 200 μL of culture medium containing 0,05 mg/mL of neutral red and incubated for 30 min. After, cells were washed twice with 200 μL of PBS. The extraction was performed with 200 μL of a solution containing 1% acetic acid, 50% ethanol and 49% of water. The absorbance was measured at 540 nm using a micro-well system reader. The IC₅₀ values (a concentration that produces 50%

reduction in the viable cell number) were calculated through a Hill concentration–response curve.

2.6. Mitochondrial potential measurement

To assay the mitochondrial membrane potential, the lipophilic cationic probe fluorochrome 5,5',6'6'-tetrachloro-,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) was used. JC-1 is a green fluorescent monomer at depolarized membrane potential or a red fluorescent J-aggregate at hyperpolarized membrane potential. Cells were plated at 5×10^5 /1 mL cells/well in 12-well dishes and incubated with the nanoparticles for 24 h. Afterward, JC-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added and incubated for 20 min at 37 °C (5% CO_2), then cells were washed twice with PBS, resuspended in 500 μL of PBS. A volume of 100 μL was used to measure the fluorescence by a spectrofluorimeter (Perkin–Elmer LS55). JC-1 was excited at 488 nm, the red emission fluorescence was detected at 590 nm and the green fluorescence was detected at 527 nm. The mitochondrial potential was presented as a ratio of 590/527 fluorescence and compared with the control cells that were considered to have 100% fluorescence. An electron transport chain uncoupler (FCCP 1 μM) was used as a positive control.

2.7. Cell cycle analysis

To analyze the cell cycle of the cells treated with nanoparticles, flow cytometry, was used following the method described elsewhere (Yang et al., 2007). The cells (4×10^5 /1 mL) were incubated with the nanoparticles, for 24 hours, in 12-well plates. After incubation, cells were released with trypsin and after centrifugation for 10 min at 25 °C and 1800 rpm, the cells pellet was washed with PBS and centrifuged again. The supernatant was discarded and 200 μL of 70% ethanol were added to the pellet, the samples were then incubated for more 30 minutes at 4°C. After incubation, 1 mL of PBS with 2% of BSA was added to the samples that were then centrifuged for 10 min at 25 °C and 1800 rpm. The supernatants were withdrawn and 0,5 μL of RNase 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.1% Triton -X in PBS were added. DNA content was analyzed by FACS flow cytometer CANTO II (BD

Biosciences). The population of cells in each phase of the cell cycle was determined using WinMDI 2.9 program.

2.8. ROS generation

Intracellular reactive species formation was determined using 20,70-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is oxidized to dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS (Sauer et al., 2003). Cells (3×10^4 cells/0,5 mL) were incubated with the nanoparticles for 24 h. After, cells were incubated with 10 μ M DCFH-DA for 30 min at 37°C and then washed four times with PBS. The DCF fluorescence signal was measured using a Perkin–Elmer LS55 spectrofluorimeter. The results were obtained as fluorescence units and were expressed as percentage of ROS, and compared with the control cells without treatment.

3. Statistical analysis

The results were presented as means \pm SD of triplicates from three-independent experiments. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Dunnet's test, and * $p < 0.05$ was taken as statistical significance.

4. Results

4.1. Particles characterization

Particles size and distribution (polydispersity index - PDI) determined by photon correlation spectroscopy (PCS) as well as the nanoparticles constitution and zeta potential are presented in Table I. As can be observed the nanoparticles have around 140 nm of diameter and low PDI value, indicative of monodisperse particles populations. Additionally, all nanoparticles showed negatively charged surface. The use of Tween 80, a non-ionic surfactant, demonstrates that negative charge of the particles is due to the lipids properties. When the SDS was used (anionic surfactant) was observed an increase in the zeta potential (from -26 mV to -39 mV) due to the presence of surfactant on the surface of negatively charged particles of F5 formulation.

Table I. Characterization of nanoparticles.

Nanoparticles Name	Lipid	Surfactant	Particles size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
F1	Solid White Vaseline USP	Tween 80	128 ± 4,1	0,32±0,02	-18
F2	<i>Butyrisoermum parkii</i>	Tween 80	144 ± 3,2	0,21±0,05	-23
F3	<i>Virola surinamensis</i>	Tween 80	135 ± 2,5	0,17±0,08	-30
F4	Tristearin	Tween 80	110 ± 4,5	0,22±0,06	-26
F5	Tristearin	SDS	116 ± 3,5	0,21±0,05	-39
F7	<i>Theobroma cacao</i>	Tween 80	167 ± 5,2	0,18±0,03	-41
F8	<i>Platonia esculenta</i>	Tween 80	173 ± 2,4	0,19±0,02	-20

4.2. Cell toxicity

In order to screen and compare the cytotoxicity induced by the nanoparticles, all of them were incubated with Vero and MDCK cell lineages, at 500 µg/mL, for 24 h. Nanoparticles F1, F2, F4 showed a mild cytotoxicity and F5 decreased strongly the cell viability of both cell lineages (Fig.1) by MTT. The nanoparticles F4 and F5 showed cytotoxicity for both lineages by neutral red assay (Fig. 2), although only F5 decreased strongly the cell viability. For the nanoparticles that showed some degree of cytotoxicity, concentration-time-response curves were obtained. The concentrations of the nanoparticles analyzed for the

determination of the IC_{50} , ranged from 0 to 1000 $\mu\text{g/mL}$. The results are presented in Table II. The nanoparticles F1, F4 demonstrated cytotoxicity in Vero cell lineage with a high IC_{50} . As can be seen, in Table II the F5 presented stronger cytotoxicity to Vero cells, with relatively lower IC_{50} .

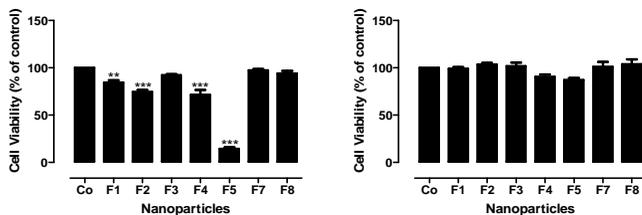


Fig. 1: Cytotoxicity of nanoparticles in Vero (A) and MDCK (B) cells lineages. The cells were incubated with the nanoparticles at 500 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h and the cell viability was assayed by MTT. Optical density of untreated cells was taken as 100% of cell viability. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

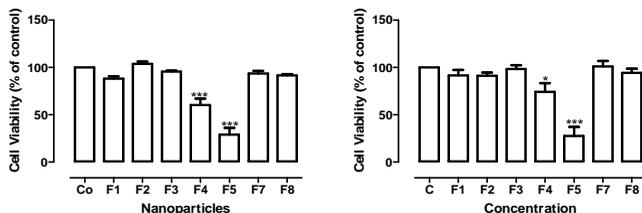


Fig. 2: Cytotoxicity of nanoparticles in Vero (A) and MDCK (B) cells. The cells were incubated with the nanoparticles at 500 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h and the cell viability was assayed by neutral red. Optical density of untreated cells was taken as 100% of cell viability. * $p < 0,05$, and *** $p < 0,001$.

Table II. The IC_{50} for cell viability assays of nanoparticles after exposure to cells.

NPs	IC ₅₀ (MTT)		IC ₅₀ (NR)	
	Vero	MDCK	Vero	MDCK
F1	489 ± 4,9	nd	nd	nd
F4	682 ± 6,7	nd	694 ± 9,3	nd
F5	247 ± 7,2	603 ± 2,7	643 ± 2,4	586 ± 15,0

* NPs = nanoparticles / * nd= not determined

4.3. ROS generation

The Figure 3 shows the results related to the cell generation of ROS induced by the nanoparticles. As can be observed in the figure, all formulations induced an oxidative stress in both cell lineages, however the effect of F5 seems to be more important if one relate this effect with the results obtained with cell viability assays.

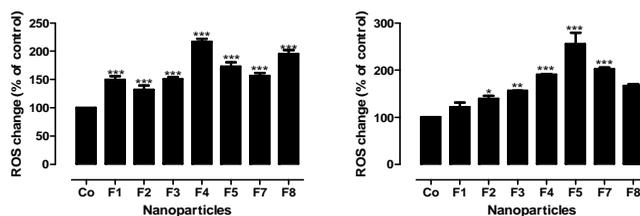


Fig. 3: Effect of nanoparticles on free radical generation in Vero (A) and MDCK (B) cell lineages. Free radical formation was followed using DCFH-DA as described in methods. The cells were incubated with the nanoparticles at 500 µg/mL for 24 h, with exception of F5 at Vero cell lineage, that was used the IC₅₀ (247 µg/mL). The results are expressed as the percentage of fluorescent cells in comparison to control samples (zero % of fluorescence). *p<0,05, **p<0,01 and ***p<0,001.

4.4. Mitochondrial potential measurement

The Figure 4 shows the results related with the effect of the formulations on mitochondrial membrane potential. It was observed that only the nanoparticles F4 and F5 decreased the mitochondrial membrane potential in Vero and MDCK cell lineages, respectively (Fig 4). Even though, the effects of both nanoparticles preparation on disturbing the mitochondrial potential were not extremely strong.

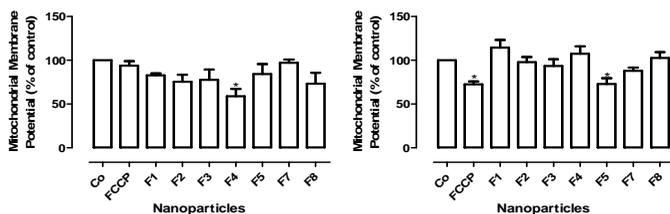


Fig. 4: Effect of nanoparticles on mitochondrial membrane potential in Vero (A) and MDCK (B) cell lineages. The membrane potential was determined using JC-1 after 24 h of incubation of the formulations at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with exception of F5 at Vero cell lineage, that was used the IC_{50} (247 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The decrease of red/green ratio indicates the decrease of mitochondrial membrane potential, and the results are expressed as percentage. The values of control cells were considered 100%. * $p < 0,05$.

4.5. Cell cycle analysis

To investigate the further effects of nanoparticles on cell-cycle distribution, Vero and MDCK cells were treated with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nanoparticles for 24 h, with except F5 nanoparticles, that was used the amount corresponding to the IC_{50} for Vero cell lineage,

and the results are summarized at Fig.5 and 6. Cultivation with nanoparticles F5 increased the population of MDCK cells in G0/G1 and G2/M cell phase, which was accompanied by a marked increase of a Sub/G1 population at 24h. G0/G1, G2/M and S indicate the cell phase, and Sub-G1 DNA content refers to the proportion of apoptotic cells (Yang et al., 2007). The untreated cells showed a typical distribution in G0/G1, G2/M and S phase by flow cytometry analysis. These results indicate that nanoparticles F5 induce cells death to MDCK cell lineage, by a apoptotic process.

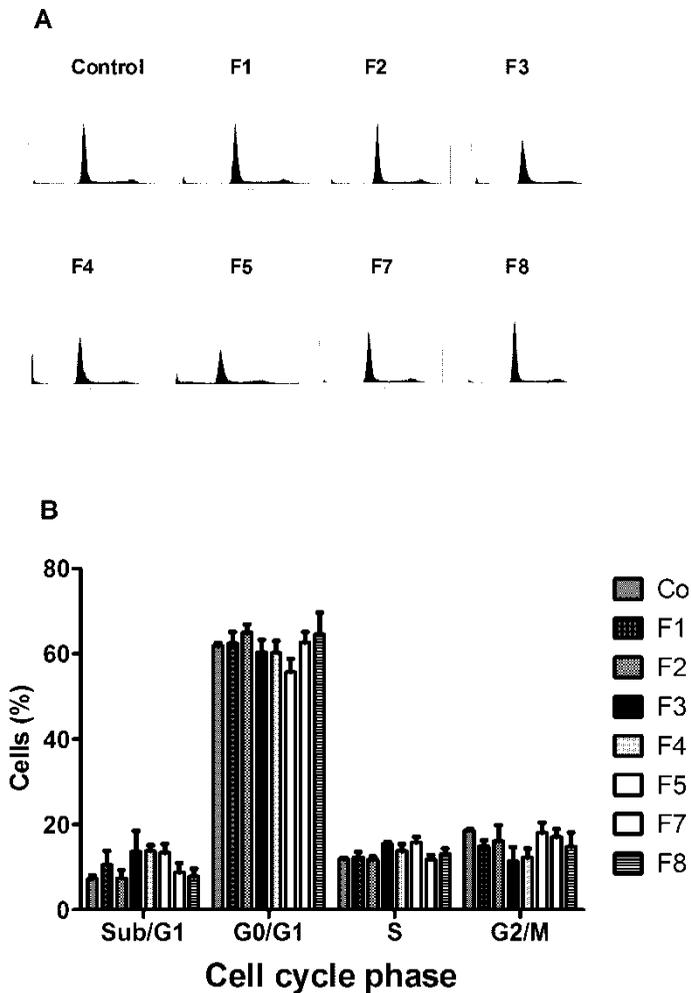


Fig. 5: Effects of nanoparticles on cell cycle distribution, on Vero cell lineage. (A) Histograms show the number of the cell channel (vertical axis) vs. DNA content (horizontal axis). (B) The cells were treated with 500 $\mu\text{g/mL}$ of the formulations for 24 h, with exception of F5 at Vero cell lineage, that was used the IC_{50} (247 $\mu\text{g/mL}$), and analyzed by DNA flow cytometry. G0/G1, G2/M and

Fig. 6: Effects of nanoparticles on cell cycle distribution, on MDCK cell lineage. (A) Histograms show number of cell channel (vertical axis) vs. DNA content (horizontal axis). (B) The cells were treated with 500 µg/mL of nanoparticles for 24 h, with exception of F5 NP that was used the IC₅₀ (247 µg/ml), and analyzed by DNA flow cytometry. G0/G1, G2/M and S indicate the cell phase, and sub-G1 DNA content refers to the proportion of apoptotic cells. Each phase was calculated by using the WinMDI 2.9 program.*p<0,05 and ***p<0,001.

5. Discussion

The purpose of this study was to investigate the biocompatibility of lipid nanoparticles. To determine whether cell toxicity occurs, in a first step, we applied distinct in vitro viability and cytotoxicity assays using Vero and MDCK cell lineages. Vero cells have been used with some frequency with the advantage of easy availability and fast growth (Bouaziz et al., 2006; Vaucher et al., 2010), and has been suggested as an appropriate model to study nephrotoxicity (Dias et al., 2009) as well as the MDCK cell lineage (Rezzani et al., 2002). These models can be used to study the cytotoxicity in vitro and predict potential toxicity in vivo to kidney.

More than one type of test should be used to determine cell viability in vitro studies, because it increases the reliability of the results. Accordingly, we used the MTT salt assay and neutral red assay. Neutral Red is based on the ability of viable cells to incorporate and bind neutral red dye into the lysosomes, thereby predicting the cytotoxicity through lysosomal activity (Repetto et al., 2008). Nanoparticles F1, F2, F4 and F5 were cytotoxic to Vero cell lineage and F5 to MDCK cell lineage by MTT, what suggests that these nanoparticles interfere at cells mitochondrial metabolism, and that Vero cells lineage is more sensitive to cytotoxic effect of nanoparticles than MDCK lineage.

NR uptake by cells occurs through a process requiring energy, being sensitive to substances that interfere with cell membrane and lysosomal permeability as well as the process of energy-dependent endocytosis (Repetto et al., 2008). The nanoparticles F4 and F5 showed cytotoxicity for both lineages by neutral red assay, exhibiting a dose-dependent inhibition of cellular

proliferation, probably by interference in cells lysosomal activity. Comparing the two methods of cell viability, the nanoparticles considered cytotoxic seem to promote changes in mitochondrial activity and interference in lysosomal activity. There are also evidences that the release of lysosomal contents to the cytosol can initiate the cascade of apoptosis, also leading to release of pro-apoptotic factors by mitochondria (Zhao et al., 2003).

To understand the mechanisms of the toxicity of nanoparticles to cells, we investigated whether an oxidative stress was involved in nanoparticles induced cell death. The generation of ROS was evaluated by DCFH assay, and except F1 in Vero lineage, all the nanoparticles induced oxidative stress, which could explain the cytotoxicity of some nanoparticles to cells. As one of the toxic mechanisms of nanoparticles, the generation of ROS seems to be most widely studied (Park et al., 2008). There are some reports that ROS production has been found in the cells treated with different kinds and concentrations of nanoparticles, such as TiO₂ (10 µg/mL) (Park et al., 2008; Shukla et al., 2011), carbon black (30 µg/mL) (Foucaud et al., 2010), ZnO (5 µg/cm²) (De Berardis et al., 2010), SiO₂ (25 µg/mL) (Wang et al., 2009), among others. Oxidative stress has been proposed as a common mechanism of cell damage induced by many types of nanoparticles (Park et al., 2008). However, it is important to remind that there is a complex system of enzymatic and non enzymatic antioxidants to protect the organism against harmful pro-oxidants (Reuter et al., 2010), and the increase in ROS production, only without a proportional increase in the production of antioxidants, can induce mitochondrial membrane permeability, damage to the respiratory chain which may trigger the apoptosis process (Valko et al., 2006). Then, although some lipid nanoparticles tested here increase the generation of ROS, this increase does not necessarily culminate in cell death.

In the same way, mitochondria have a crucial function controlling the cell death process, besides they play a crucial role in maintaining the bioenergetics status of cells (Szabo et al., 2011). The impairment of mitochondrial function by nanoparticles can have drastic consequences, upsetting the balance and cellular functions (Teodoro et al., 2011). In this regard our results showed that only the ROS generation by lipid nanoparticles F4 and F5

seems to involve mitochondria in the process of cell death, they decrease the mitochondrial membrane potential in Vero and in MDCK cell lineages. The differences in cytotoxicity induced by the nanoparticles between VERO and MDCK cell lineages is probably due to the differences in the characteristic of the cell lineages to respond to an oxidative stress for example. For this reason we tested the formulations in two cell lineages and assayed the cell viability monitoring different cell functions.

By flow cytometry we confirmed the cytotoxicity found with cell viability assays and determined the kind of cell death. Cell cultivation with F5 decreased the population of MDCK cells in G0/G1 and G2/M cell phase, which was accompanied by a marked increase of a Sub/G1 population at 24h. Sub-G1 DNA content refers to the proportion of apoptotic cells (Ormerod, 2002; Yang et al., 2007).

In conclusion, the lipid nanoparticles studied here showed to be biocompatible since only some of them showed a mild cytotoxicity. Even the formulation F5 that showed to be more cytotoxic between them, it seems to induce cell death with very high concentrations, if we compare with the cytotoxicity induced by metallic nanoparticles such as TiO_2 , that with $10 \mu\text{g}$ showed to be cytotoxic to mitochondria (Freyre-Fonseca et al., 2011). Additionally, even for the formulation F4 that also showed to be cytotoxic, although less than the F5, the IC_{50} for cell viability is very high, $\sim 700 \mu\text{g}/\text{mL}$ for both cell lineages tested.

The reason of the higher cytotoxicity of the formulation F5 will be further studied, however we have some evidences that is the presence of SDS (sodium dodecyl sulphate). Recently, (Caon et al., 2010) reported that nanoparticles produced with SDS are more cytotoxic when compared with nanoparticles produced with other surfactants. The SDS has shown an irritant potential in compatibility tests carried out on cell culture particularly due to its solubilizing ability of membrane lipids (Spiekstra et al., 2009). However, it should be remarked that cytotoxic effects of particulate carrier systems differ, depending on the cell lines used, due to metabolic abilities (e.g. enzymes present) and capabilities of these cell lines. Basically the nanoparticles tested here are biocompatible if used at relatively low concentrations. Further studies are required to elucidate the mechanism of action

of these nanoscale structures, in order to determine the implication of their increased and widespread use.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina). This paper forms part of the Pharmacy master studies of Adny Henrique Silva. The group wishes to thank the LAMEB – Laboratório Multi Usuário de Estudos em Biologia-CCB/UFSC, for the use of its facilities.

References

- Ahamed M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro* 2011.
- Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; 79: 1127-55.
- Bouaziz C, Abid-Essefi S, Bouslimi A, El Golli E, Bacha H. Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. *Toxicon* 2006; 48: 343-52.
- Caon T, Zanetti-Ramos BG, Lemos-Senna E, Cloutet E, Cramail H, Borsali R, et al. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity of polyurethane-based nano- and microparticles as promising biomaterials for drug delivery systems. *Journal of Nanoparticle Research* 2010; 12: 10.
- Chattopadhyay P, Shekunov BY, Yim D, Cipolla D, Boyd B, Farr S. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 444-53.
- De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, et al. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative

- stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010.
- Dias E, Andrade M, Alverca E, Pereira P, Batoréu MC, Jordan P, et al. Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicol* 2009; 53: 487-95.
- Dias N, Bailly C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1-12.
- Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 362-74.
- Foucaud L, Goulaouic S, Bennasroune A, Laval-Gilly P, Brown D, Stone V, et al. Oxidative stress induction by nanoparticles in THP-1 cells with 4-HNE production: stress biomarker or oxidative stress signalling molecule? *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 1512-20.
- Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Gutiérrez-Cirlos EB, Calderón-Torres CM, Cabellos-Avelar T, Sánchez-Pérez Y, et al. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicol Lett* 2011; 202: 111-9.
- Hsiao IL, Huang YJ. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Sci Total Environ* 2011; 409: 1219-28.
- Hu X, Cook S, Wang P, Hwang HM. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci Total Environ* 2009; 407: 3070-2.
- Ivanova L, Uhlig S. A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures. *Anal Biochem* 2008; 379: 16-9.
- Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 161-72.
- Kwon SM, Nam HY, Nam T, Park K, Lee S, Kim K, et al. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *J Control Release* 2008; 128: 89-97.

- Liu J, Gong T, Fu H, Wang C, Wang X, Chen Q, et al. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm* 2008; 356: 333-44.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Müller RH, Runge S, Ravelli V, Mehnert W, Thünemann AF, Souto EB. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int J Pharm* 2006; 317: 82-9.
- Nassimi M, Schleh C, Lauenstein HD, Hussein R, Hoymann HG, Koch W, et al. A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2010; 75: 107-116.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-7.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 823-39.
- Ormerod MG. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 2002; 265: 73-80.
- Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366: 170-84.
- Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 2008; 180: 222-9.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008; 3: 1125-31.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1603-16.
- Rezzani R, Angoscini P, Borsani E, Rodella L, Bianchi R. Cyclosporine A-induced toxicity in two renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK). *Histochem J* 2002; 34: 27-33.

- Sauer H, Wefer K, Vetrugno V, Pocchiari M, Gissel C, Sachinidis A, et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 586-94.
- Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 231-41.
- Spiekstra SW, Dos Santos GG, Scheper RJ, Gibbs S. Potential method to determine irritant potency in vitro - Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 349-55.
- Szabo A, Balog M, Mark L, Montsko G, Turi Z, Gallyas F, et al. Induction of mitochondrial destabilization and necrotic cell death by apolar mitochondria-directed SOD mimetics. *Mitochondrion* 2011.
- Teodoro JS, Simões AM, Duarte FV, Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM, et al. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 664-70.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
- Vaucher RA, Teixeira ML, Brandelli A. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. *Curr Microbiol* 2010; 60: 1-5.
- Wang F, Gao F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol In Vitro* 2009; 23: 808-15.
- Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res* 2010; 62: 90-9.
- Yang L, Wu S, Zhang Q, Liu F, Wu P. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). *Cancer Lett* 2007; 256: 267-78.
- Yuan H, Zhang W, Du YZ, Hu FQ. Ternary nanoparticles of anionic lipid nanoparticles/protamine/DNA for gene delivery. *Int J Pharm* 2010; 392: 224-31.

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3778-86.

