

Adny Henrique Silva

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS
COMPOSTAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO,
SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO E DE
POLIURETANO *IN VITRO*, *IN VIVO*, *EX VIVO* E *IN SILICO***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Florianópolis – SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Henrique Silva, Adny

Avaliação toxicológica de nanopartículas compostas de dióxido de titânio, superparamagnéticas de óxido de ferro e de poliuretano in vitro, in vivo, ex vivo e in silico / Adny Henrique Silva ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa - Florianópolis, SC, 2015.
175 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Nanotoxicologia. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.


“Avaliação toxicológica de nanopartículas compostas de dióxido de titânio, superparamagnéticas de óxido de ferro e de poliuretano in vitro, in vivo, ex vivo e in silico”

POR

Adny Henrique Silva


Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:


Banca Examinadora:

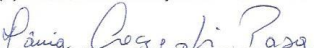

Prof(a). Dr(a). Letícia Mazzarino (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Solange Cristina Garcia (UFRGS – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Adriana Raffin Pohlmann (UFRGS - Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientador)


Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 04 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser o maior responsável pela minha existência e pela existência de tudo e todos que dão sentido a minha vida;

À minha família, meu porto seguro e meu alicerce em todos os momentos, por investirem na minha educação e me apoiarem em todos os meus objetivos. Meus pais Quirino e Ednéia, e irmãos João Eugenio e Josinéia, dedico esta tese a vocês;

À Prof.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa, minha “mãe científica”, por ser minha orientadora e amiga no decorrer de seis anos de convivência e auxílio. Obrigada por possibilitar fazer parte deste grupo que se tornou uma grande família graças a você;

Aos colegas do laboratório (GEIMM) que hoje posso chamar de amigos. Aos que ainda tenho o privilégio de conviver diariamente, aos que já seguiram seus caminhos, muito obrigada pelo carinho, amizade, incentivo e parceria em todos esses anos;

À Prof.^{ta} Claudriana Locatelli, pelo auxílio nos experimentos *in vivo*, pelas conversas sobre a profissão, a carreira de pesquisador e pela amizade;

Ao Prof. Ênio Lima, Dra. Betina Zanetti Ramos, Prof. Juan C. Benech, Natalia Oddone, Dr. Vinícius Zoldan, Dra. Evelyn Winter, Prof. Celso Pilati, Prof.^{ta} Fabíola B. Filippin-Monteiro e Prof. André A. Pasa pela colaboração e contribuição neste trabalho;

Ao Prof. Andrew Owen, Dr. Marco Siccardi e a todos os estudantes e pesquisadores do grupo de pesquisa em farmacologia clínica e molecular da Universidade de Liverpool, obrigada por me receberem de maneira tão acolhedora e propiciar dez meses de convívio e aprendizado nesta universidade;

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com esta tese;

Aos servidores desta universidade, em especial a Sra. Ivonete Agapito, que além de manter o laboratório em ordem ainda nos trata como filhos, e ao Bruno, por estar sempre disposto a colaborar;

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter possibilitado o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

Ao CNPq, CAPES, Ciências sem Fronteiras e FAPESC pelo suporte financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

A nanotecnologia envolve a compreensão e manipulação da matéria em escala nanométrica, em que os materiais adquirem propriedades diferentes dos materiais na forma bruta, possibilitando aplicações nas mais diversas áreas e produtos de consumo. Porém, as propriedades dos materiais nessa escala de tamanho também podem determinar as interações e efeitos nos organismos vivos. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NPs), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONS) e nanopartículas de poliuretano (PU-NPs), usando metodologias *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*. Os resultados obtidos foram divididos em capítulos, de acordo com o sistema nanoestruturado avaliado. O primeiro capítulo desse trabalho mostra os resultados da avaliação dos efeitos *in vivo* da administração intraperitoneal de TiO₂-NPs em camundongos albinos. Observou-se que além da diminuição do ganho de peso, após o tratamento os animais apresentaram aumento significativo no acúmulo de gordura abdominal, inflamação do tecido adiposo e dano ao fígado e estômago. Por fim, identificou-se a presença de titânio no baço, fígado e rins dos camundongos. O segundo capítulo teve como objetivo a avaliação *in vitro* e *in vivo* de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000, assim denominadas de acordo com o peso molecular da cadeia de PEG ligada as SPIONS. Em resumo, as SPIONS aqui avaliadas não induziram toxicidade *in vitro*, até a máxima concentração de 100 µg/ml, em três linhagens celulares. Ainda, ambas as formulações de nanopartículas foram captadas pelas células, com maior captação e acúmulo de SPION-PEG2000. A formulação de SPION-PEG2000 foi também avaliada *in vivo*, e de acordo com as concentrações e parâmetros avaliados, não induziu toxicidade, apesar do acúmulo em órgãos como baço, fígado, pulmão e coração. O terceiro capítulo trata da avaliação do efeito *in vivo* e *ex vivo* de PU-NPs. Para o estudo *in vivo*, a administração de três doses de PU-NPs foi feita pelas vias oral e intraperitoneal (i.p.), o que resultou em inflamação e prejuízo das funções do fígado nos animais tratados independentemente da via. Os estudos *ex vivo*, usando macrófagos derivados de monócitos primários humanos confirmaram o efeito pró-inflamatório de PU-NPs com o aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias no meio de cultura celular após tratamento com as partículas. O quarto e último capítulo deste trabalho mostra os resultados obtidos no desenvolvimento de um modelo farmacocinético para avaliação do acúmulo de SPION-PEG2000 em camundongos e humanos. O modelo desenvolvido para

camundongos foi validado com os resultados obtidos experimentalmente, com os camundongos tratados pela via endovenosa com três diferentes concentrações de SPION-PEG2000. Os resultados de distribuição e acúmulo obtidos com o modelo foram similares aos obtidos *in vivo*, descrevendo um maior acúmulo de SPION-PEG2000 no baço, fígado e pulmão. Com base nos resultados obtidos para camundongos, o mesmo modelo foi desenvolvido para humanos, considerando os parâmetros fisiológicos dessa espécie, sendo os resultados similares aos obtidos para animais, com maior acúmulo estimado para o pulmão, baço e fígado.

Palavras chave: toxicidade, nanotecnologia, nanotoxicologia, nanopartículas, nanopartículas de dióxido de titânio, nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, nanopartículas de poliuretano.

ABSTRACT

Nanotechnology involves the understanding and manipulation of matter at the nanoscale, where materials acquire distinct characteristics of the materials in the bulk form, which allows its applications in several areas and consumer products. However, the properties of materials in this size range also might determine their interaction and effects on living organisms. The objectives of this study was to assess the effects and potential toxicity of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs), superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) and polyurethane nanoparticles (PU-NPs) using *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* and *in silico* approaches. The results were presented in chapters according to the nanostructured system evaluated. The first chapter of this thesis shows the results of *in vivo* toxicological evaluation of intraperitoneal administration of TiO₂-NPs in albino mice. It was observed that, in addition to significant decrease in body weight gain after treatment with TiO₂-NPs, animals showed a significant increase in abdominal fat accumulation, adipose tissue inflammation, liver and stomach damage. Finally, it was identified the presence of titanium in the spleen, liver and kidneys of mice. The second chapter aimed to evaluate SPION-PEG350 and SPION-PEG2000, named according to the molecular weight of the PEG, using *in vitro* and *in vivo* methodologies. In summary, the SPIONS did not induce toxicity up to 100 µg/ml, in three cell lineages. Further, both formulations of nanoparticles were taken up by cells, with a higher uptake and accumulation of SPION-PEG2000. SPION-PEG2000 was also evaluated *in vivo* and according to the concentrations and parameters evaluated they did not induce toxicity, although the accumulation in organs such as the spleen, liver, lung and heart was observed. The third chapter is about the assessment of *in vivo* and *ex vivo* effect of PU-NPs. For the *in vivo* study, three doses of PU-NPs were administrated by oral or intraperitoneal (i.p.) routes, resulting in inflammation and impairment of liver function in both groups of treated mice. *Ex vivo* studies using human monocytes-derived macrophages have confirmed proinflammatory effects of PU-NPs with significant increase of proinflammatory cytokines after treatment of macrophages with nanoparticles. The fourth and last chapter of this study shows the results obtained in the development of a pharmacokinetic model to predict the pharmacokinetic SPION-PEG2000 in mice and humans. The model was validated toward *in vivo* results obtained with mice. The accumulation profile obtained with the model was similar to those obtained *in vivo*, describing higher accumulation of SPION-PEG2000 in

the spleen, liver and lung. Based on the results obtained for mice, the same model was developed for humans, taking into account the physiological parameters of this species, and the results were similar to those obtained with animals, with higher accumulation in the lung, spleen and liver.

Keywords: toxicity, nanotechnology, nanotoxicology, nanoparticles, titanium dioxide nanoparticles, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, polyurethane nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nanopartículas orgânicas e inorgânicas.....	33
Figura 2. Interação das nanopartículas com as células: alvos intracelulares e mecanismos de toxicidade.....	36
Figura 3. Propriedades e possíveis interações das nanopartículas com os sistemas vivos.....	38
Figura 4. Aspectos relacionados à nanotoxicologia.	39
Figura 5. Número de publicações relacionadas à biodistribuição, toxicidade e aplicação das nanopartículas (NPs) nos últimos anos, segundo a base de dados PubMed.	47
Figura 6. Delineamento experimental para avaliação da toxicidade e/ou efeitos sub-crônicos após tratamento com TiO ₂ -NPs.....	57
Figura 7. Efeitos do tratamento com TiO ₂ -NPs sobre o peso, índice de Lee e acúmulo de gordura.	60
Figura 8. Análise histológica do tecido adiposo do abdômen dos animais após tratamento com TiO ₂ -NPs.....	61
Figura 9. Análise histológica do fígado e estômago após tratamento com TiO ₂ -NPs.....	62
Figura 10. Determinação da presença de titânio nos órgãos dos animais tratados com TiO ₂ -NPs.....	64
Figura 11. Representação esquemática das SPIONS.	71
Figura 12. Delineamento experimental para avaliação <i>in vitro</i> de SPION-PEG2000 e SPION-PEG350.	72
Figura 13. Delineamento experimental para avaliação da toxicidade e/ou efeitos sub-crônicos após tratamento com SPION-PEG2000.	75
Figura 14. Toxicidade de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 em células Vero (A), MDCK (B) e NIH-3T3 (C).	79
Figura 15. Avaliação da captação celular de SPION-PEG350-FITC e SPION-PEG-2000-FITC por microscopia confocal.....	80
Figura 16. Avaliação da captação celular de SPION-PEG350 (A) e SPION-PEG2000 (B) pela medida do magnetismo.	82
Figura 17. Interação entre SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 e proteínas ligadas a substâncias fluorescentes.....	83
Figura 18. Avaliação da interação/captação de SPION-PEG2000 pela linhagem NIH-3T3 usando microscopia de força atômica (AFM).....	84

Figura 19. Variação do peso dos animais após administração endovenosa de SPION-PEG2000.....	85
Figura 20. Efeito da administração endovenosa de SPION-PEG2000 nos níveis séricos das citocinas interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).	88
Figura 21. Acúmulo de SPION-PEG2000 nos órgãos dos animais após tratamento endovenoso.	89
Figura 22. Delineamento experimental para avaliação <i>ex vivo</i> de PU-NPs.....	98
Figura 23. Delineamento experimental para avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> de PU-NPs.....	101
Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de PU-NPs.	103
Figura 25. Variação de peso dos animais tratados com PU-NPs.	105
Figura 26. Efeito de PU-NPs no acúmulo de gordura visceral.	106
Figura 27. Efeito de PU-NPs nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α	107
Figura 28. Efeito de PU-NPs na liberação de citocinas pro-inflamatórias por macrófagos derivados de monócitos humanos.	108
Figura 29. Análise histopatológica da gordura visceral dos camundongos após tratamento com PU-NPs pela via i.p.....	109
Figura 30. Interação entre PU-NPs e proteínas ligadas a substâncias fluorescentes.	112
Figura 31. Efeito de PU-NPs no tempo de protrombina.	115
Figura 32. Delineamento experimental para avaliação da captação de SPION-PEG2000 por macrófagos derivados de monócitos humanos.	122
Figura 33. Diagrama esquemático do modelo farmacocinético murino e para humanos.	123
Figura 34. Captação de SPION-PEG2000 por macrófagos derivados de monócitos primários.....	129
Figura 35. Resultados obtidos no modelo farmacocinético e <i>in vivo</i> ..	131
Figura 36. Avaliação do acúmulo de SPION-PEG2000 em humano obtido por meio do modelo farmacocinético.	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos dos animais controle e tratados com 2 mg/kg/dia de TiO ₂ -NPs.	54
Tabela 2. Peso dos órgãos dos camundongos controle e tratados com 2 mg/kg/dia de TiO ₂ -NPs.	54
Tabela 3. Parâmetros hematológicos após tratamento com 2 mg/kg/dia de TiO ₂ -NPs.	55
Tabela 4. Peso dos órgãos dos camundongos após administração endovenosa de SPION-PEG2000.	86
Tabela 5. Parâmetros hematológicos dos camundongos após administração endovenosa de diferentes concentrações de SPION-PEG2000.	87
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos dos animais controle e tratados com SPION-PEG2000.	90
Tabela 7. Peso dos órgãos dos camundongos tratados pela via i.p. com PU-NPs.	105
Tabela 8. Peso dos órgãos dos camundongos tratados pela via oral com PU-NPs.	106
Tabela 9. Parâmetros bioquímicos dos animais tratados pela via i.p. com diferentes doses de PU-NPs.	110
Tabela 10. Parâmetros bioquímicos dos animais tratados pela via oral com diferentes doses de PU-NPs.	110
Tabela 11. Parâmetros hematológicos dos animais controle e tratados com PU-NPs pela via i.p.	113
Tabela 12. Parâmetros hematológicos dos animais controle e tratados com PU-NPs pela via oral.	113
Tabela 13. Parâmetros hematológicos após incubação de diferentes concentrações de PU-NPs com sangue humano por 1 hora.	114
Tabela 14. Parâmetros hematológicos após incubação de diferentes concentrações de PU-NPs com sangue humano por 2 horas.	115
Tabela 15. Fluxo sanguíneo nos órgãos dos camundongos.	123
Tabela 16. Constantes de excreção e liberação para camundongos e humanos.	124
Tabela 17. Tipo e classificação capilar de acordo com a região do corpo.	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de força atômica
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato transaminase
ATCC	American Type Cell Culture
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
BHK21	Linhagem celular derivada de rins de hamster
DAPI	4'-6- diamino-2-fenilidol
DMSO	Dimetilsufóxido
DMEM	Meio de cultura dulbeco
CHCM	Concentração da hemoglobina celular média
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FeCl ₃	Cloreto férrico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HaCaT	Linhagem celular derivada de queratinócito humano
HBBS	Solução balanceada de Hank's
HCM	Hemoglobina celular média
HepG2	Linhagem celular derivada de hepatoma humano
Hepes	N-[2-Hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HT29	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma de colo humano
HCl	Ácido clorídrico
HNO ₃	Ácido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intraperitoneal
IMDM	Meio de dulbeco modificado por Iscove
IL-6	Interleucina 6
KMnO ₄	Permanganato de potássio
L929	Linhagem celular derivada de fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongo
LDH	Enzima lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MACS	Sistema de separação de células
MCF-S	Fator de estímulo para formação de colônia de macrófagos
MDCK	Linhagem celular derivada de fibroblasto renal de cachorro
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaOH	Hidróxido de sódio
NIH-3T3	Linhagem celular de fibroblasto de embrião de camundongo
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
NPS	Nanopartículas

OECD	Organização para cooperação e desenvolvimento econômico
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBPK	Modelo farmacocinético baseado na fisiologia
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Poliétileno glicol
PFA	Polifluor alcóxi
PU	Poliuretano
PU-NPs	Nanopartículas de poliuretano
RPMI 1640	Meio de cultura criado pelo Instituto Park Roswell
SFB	Soro fetal bovino
SRE	Sistema reticuloendotelial
SPION-PEG2000	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas ligadas ao PEG2000
SPION-PEG350	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas ligadas ao PEG350
SPIONS	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TiO ₂ -NPs	Nanopartículas de dióxido de titânio
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCM	Volume corpuscular médio
Vero	Linhagem celular derivada de epitélio renal de macaco
XTT	2,3-bis-(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

SUMÁRIO

Introdução	23
1. Objetivo Geral.....	25
1.1 Objetivos específicos	25
2. Revisão Bibliográfica.....	27
2.1 Nanotecnologia.....	27
2.1.1 Aplicações da nanotecnologia	28
2.1.1.1 Tratamento da água.....	28
2.1.1.2 Nanotecnologia nos alimentos	29
2.1.1.3 Nanotecnologia em cosméticos.....	29
2.1.1.4 Nanotecnologia em tecidos	30
2.1.1.5 Nanotecnologia na terapêutica, diagnóstico e prevenção.....	31
2.2 Nanotoxicologia e os estudos de toxicidade.....	33
2.2.1 Propriedades físico-químicas dos sistemas nanoestruturados relacionados com a toxicidade	37
2.2.2 Modelos para caracterizar a toxicidade de materiais nanoestruturados	41
2.2.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	41
2.2.2.2 Estudos <i>in vivo</i>	43
2.2.2.3 Estudos <i>ex vivo</i>	46
2.2.2.4 Estudos <i>in silico</i>	47
CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO ₂ -NPs).....	51
1. Introdução	53
2. Materiais e Métodos.....	55

2.1	Reagentes	55
2.2	Estudos <i>in vivo</i>	56
2.2.1	Animais	56
2.2.2	Tratamentos.....	56
2.2.3	Parâmetros de toxicidade	57
2.3	Análise estatística.....	58
3.	Resultados e Discussão.....	58
4.	Conclusões.....	65
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO (SPIONS)		67
1.	Introdução.....	69
2.	Materiais e Métodos	70
2.1	Reagentes	70
2.2	Síntese e caracterização das SPIONS.....	70
2.3	Estudos <i>in vitro</i>	71
2.1.1	Cultura Celular.....	72
2.1.2	Ensaio de viabilidade MTT com SPIONS	72
2.1.3	Avaliação da captação das SPIONS pelas células pela medida do magnetismo	73
2.1.4	Avaliação da captação das SPIONS pelas células por microscopia confocal.....	73
2.1.5	Avaliação da interação das SPIONS com as células por meio da microscopia de força atômica (AFM)	74
2.1.6	Avaliação da interação de SPIONS com proteínas	74
2.2	Estudos <i>in vivo</i>	74
2.2.1	Animais	74

2.2.2	Tratamentos.....	75
2.2.3	Parâmetros de toxicidade.....	76
2.3	Análise estatística.....	77
3.	Resultados e Discussão.....	77
3.1	Estudos <i>in vitro</i>	77
3.2	Estudos <i>in vivo</i>	85
4.	Conclusões.....	90
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE POLIURETANO (PU-NPs).....		93
1.	Introdução.....	95
2.	Materiais e métodos.....	96
2.1	Reagentes.....	96
2.2	Síntese e caracterização das nanopartículas.....	96
2.3	Síntese e caracterização de PU-NPs.....	96
2.4	Estudos <i>in vitro</i>	97
2.5	Estudos <i>ex vivo</i>	97
2.5.1	Cultura de células derivadas de sangue periférico humano.....	98
2.5.2	Efeito de PU-NPs na liberação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos derivados de sangue humano.....	98
2.5.3	Parâmetros hematológicos após tratamento de sangue periférico humano com PU-NPs.....	99
2.5.4	Efeito de PU-NPs no tempo de protrombina.....	100
2.6	Estudos <i>in vivo</i>	100
2.6.1	Animais.....	100
2.6.2	Tratamento.....	101
2.6.3	Parâmetros de toxicidade.....	102

2.7	Análise estatística.....	103
3.	Resultados e Discussão.....	103
4.	Conclusões.....	116
CAPÍTULO 4. MODELO FARMACOCINÉTICO PARA PREDIÇÃO DO ACÚMULO DE SPIONS EM CAMUNDONGOS E HUMANOS		117
1.	Introdução.....	119
2.	Materiais e Métodos	120
2.1	Reagentes	120
2.2	Estudos <i>ex vivo</i>	120
2.2.1	Avaliação da captação das SPIONS por macrófagos humanos.....	120
2.3	Estudos <i>in silico</i>	122
2.3.1	Modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK) para predição do acúmulo <i>in vivo</i> de SPION-PEG2000.....	122
2.4	Análise estatística.....	127
3.	Resultados e Discussão.....	127
4.	Conclusões.....	133
3	Conclusões gerais	135
	Perspectivas.....	137
	Anexo 1 – Parecer do comitê de ética no uso de animais.	139
	Apêndice A - Capítulo do Ebook “Temas da Rio +20: desafios e perspectivas”, publicado em mídia eletrônica e apresentado em forma de debate na Rio +20, 2012, no Rio de Janeiro.	140
	Apêndice B – Artigo a ser submetido a revista Material Science and Engineering with Advanced Research	141
	Apêndice C - Artigo a ser submetido a revista Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.....	142

Apêndice D – Artigo a ser submetido a revista Acta Biomaterialia....	143
Apêndice E – Artigo submetido a revista Nanotoxicology.	144
Apêndice F - Artigo publicado na revista Nanotoxicology.	145
Apêndice G – Artigo publicado na revista Journal of Biomedical Materials Research b: Applied Biomaterial.	146
Apêndice H – Artigo publicado na revista Toxicology in Vitro.	147
Apêndice I – Artigo publicado na revista Chemical Research in Toxicology.	148
Apêndice J – Artigo publicado na revista International Journal of Environmental Research and Public Health.	149
Apêndice K - Artigo publicado na revista International Journal of Environmental Research and Public Health.	150
Referências.....	151

Introdução

A nanotecnologia é considerada uma das tecnologias do futuro e envolve a manipulação e aplicação de estruturas ou sistemas que tenham pelo menos uma de suas dimensões menores que 100 nm (HOYT e MASON, 2008; SAFARI e ZARNEGAR, 2014). O avanço dessa tecnologia resultou na identificação de propriedades únicas e inerentes aos materiais estruturados, o que aumenta a utilização e aplicação nas mais diversas áreas (QIN *et al.*, 1999; WEBSTER *et al.*, 1999; FERRARI, 2005).

Materiais nanoestruturados vêm sendo empregados em diversos produtos de consumo como cosméticos (MENARD *et al.*, 2011; MIHRANYAN *et al.*, 2012), embalagens (CHEN *et al.*, 2006), semicondutores (NEL *et al.*, 2006a), sistemas para purificação de água (QU *et al.*, 2013b), além da aplicação no campo da medicina, especialmente no carregamento de fármacos e genes, como biossensores, no contraste para ressonância magnética, entre outros (JOSHI e MÜLLER, 2009; LINKOV *et al.*, 2009; AGASTI *et al.*, 2010; VENKATARAMAN *et al.*, 2011).

A utilização desta tecnologia em aplicações industriais e na medicina, assim como em diversos produtos de consumo, aponta para a necessidade de avaliação do potencial risco a saúde humana e ao meio ambiente (DONALDSON *et al.*, 2004b; OBERDORSTER, 2010). Assim, a nanotoxicologia, uma subcategoria da toxicologia, busca estabelecer uma relação entre as características dos materiais nanoestruturados, com o potencial efeito tóxico ao homem e ao meio ambiente, propondo protocolos e modelos para os ensaios de toxicidade e auxiliando nos aspectos regulatórios dessa utilização (HOYT e MASON, 2008).

Com base no exposto, este trabalho visa à utilização de diferentes modelos para a avaliação da toxicidade de diferentes sistemas nanoestruturados com potencial aplicação nas áreas farmacêutica e biomédica, buscando estabelecer uma relação entre as características dos materiais e os efeitos encontrados, além da caracterização da segurança para posterior utilização como carreadores de fármacos ou em tratamentos medicinais.

1. Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2 -NPs), superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONS) e de poliuretano (PU-NPs) usando metodologias *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*.

1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de SPIONS por meio do ensaio de viabilidade celular MTT;
- Avaliar a captação celular de SPIONS por meio de microscopia confocal, microscopia de força atômica, medida do magnetismo e ensaio colorimétrico;
- Avaliar a interação de SPIONS e PU-NPs com proteínas;
- Avaliar a interação de PU-NPs com células sanguíneas humanas;
- Avaliar o efeito de PU-NPS no tempo de protrombina;
- Avaliar o efeito de PU-NPs na liberação de citocinas pró inflamatórias em macrófagos derivados de sangue humano;
- Avaliar a toxicidade de TiO_2 -NPs, SPIONS e PU-NPs *in vivo*, por meio de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos;
- Avaliar a resposta pró-inflamatória à SPIONS e PU-NPs por meio da análise dos níveis séricos de citocinas pró inflamatórias;
- Caracterizar o acúmulo de TiO_2 -NPs nos órgãos dos animais tratados usando ICP-MS;
- Caracterizar o acúmulo de SPIONS nos órgãos dos animais tratados por meio da medida do magnetismo;
- Desenvolver um modelo farmacocinético para predição do acúmulo de SPIONS em camundongos e humanos;

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Nanotecnologia

O Comitê técnico do workshop “Iniciativas na Nanotecnologia Nacional”, realizado em 2010 na cidade de Arlington, Virgínia, USA, publicou uma definição de nanotecnologia que diz: “a nanotecnologia inclui a compreensão e controle da matéria em dimensões entre aproximadamente 1 e 100 nanômetros em que fenômenos únicos permitem novas aplicações”. Segundo recomendação da União Européia, nanomaterial é definido como material natural, acidental ou fabricado que contenha partículas, em estado agregado, desagregado ou aglomerado, em que a distribuição de tamanho esteja entre 1 e 100 nm para 50% ou mais das partículas (European commission, 2015). No entanto, para aplicações biomédicas esta definição inclui sistemas nanoestruturados com até 1000 nm, preparados com diferentes materiais (KAYSER *et al.*, 2005; STERN e MCNEIL, 2008b; DUNCAN e GASPAS, 2011; ELZOGHBY *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2012; VIDEIRA *et al.*, 2012).

As propriedades físico-químicas não usuais dos sistemas nanoestruturados são atribuídas ao pequeno tamanho, composição química, estrutura de superfície, forma, solubilidade e agregação. Quando o tamanho das partículas é reduzido ao tamanho nanométrico, o material resultante apresenta propriedades diferentes das propriedades dos materiais na escala macro, mesmo sendo produzidos com as mesmas substâncias (NEL *et al.*, 2006b; DUNCAN, 2011). Para Donaldson e colaboradores (2004) e Council (2010), a nanotecnologia utiliza as propriedades dos materiais estruturados em tamanho nanométrico para criar melhores dispositivos e sistemas que as explorem (DONALDSON *et al.*, 2004a; COUNCIL, 2010).

A pesquisa relacionada à nanotecnologia vem crescendo ao longo da última década, e já existem inúmeras empresas especializadas na fabricação de produtos utilizando esta tecnologia. Entre os produtos estão incluídos aqueles relacionados às áreas médica, de produção de energia, computação molecular, entre outras. Em 2008 foram gastos mais de 15 bilhões de dólares em pesquisas nessa área, empregando mais de 400 mil pesquisadores em todo o mundo. Projeta-se que a nanotecnologia impactará em pelo menos 3 trilhões de dólares a economia mundial em 2020, sendo necessários em torno de 6 milhões de pessoas trabalhando com esta tecnologia (ROCO e HERSAM, 2010).

2.1.1 Aplicações da nanotecnologia

A nanotecnologia ganhou grande popularidade recentemente por conta do rápido desenvolvimento de técnicas para sintetizar e caracterizar materiais e dispositivos estruturados em escala nanométrica, assim como pela promessa de aplicação nas mais variadas áreas, incluindo medicina, farmácia, eletrônica, química e engenharia. Neste sentido, abordar-se-á algumas dessas áreas de forma breve e sucinta objetivando ilustrar o quão difundido essa tecnologia se encontra, o que aumenta a necessidade de uma regulamentação mais rigorosa dos produtos resultantes bem como do descarte dos rejeitos gerados.

2.1.1.1 Tratamento da água

Uma das possíveis aplicações da nanotecnologia é no tratamento da água. O acesso de todas as pessoas a água limpa é considerado um direito básico e continua sendo um grande desafio global para este século. Os recentes avanços na nanotecnologia oferecem oportunidades para o desenvolvimento de sistemas de abastecimento de água de última geração, permitindo o aproveitamento da água de fontes não convencionais, além de possibilitar o tratamento de águas residuais (BRAME *et al.*, 2011; QU *et al.*, 2013b), o que permitiria um ganho econômico além de expandir o abastecimento de água.

Segundo Li e colaboradores (2008), o processo de descontaminação da água utilizando nanopartículas está focado principalmente (i) na remoção de poluentes utilizando características adsorptivas de alguns materiais; (ii) degradação catalítica; (iii) controle microbiano e (iv) filtração (BRAME *et al.*, 2011).

Nanopartículas possuem grande capacidade adsorvente por conta da grande área de superfície. Nanopartículas magnéticas podem ser usadas para remoção de metais pesados da água, e são extremamente atrativos, pois podem ser facilmente removidos da água por meio de magnetização (BRAME *et al.*, 2011). Fullerenos e dióxido de titânio, na presença de radiação UV apresentam atividade fotocatalítica podendo auxiliar na degradação de poluentes químicos usados, por exemplo, na agricultura, ou ainda na remoção de patógenos microbianos (DUNLOP *et al.*, 2002).

A descontaminação da água por microorganismos patógenos pode ser feita também por meio de nanopartículas de prata, uma vez que

a liberação de íons por estes materiais pode gerar dano em proteínas e enzimas, impedir a replicação do DNA e induzir alterações no envelope bacteriano (QU *et al.*, 2013a). Para Chamakura e colaboradores, em um trabalho publicado em 2011, a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata demonstrou ser maior que a atividade antimicrobiana de alguns desinfetantes químicos já conhecidos (CHAMAKURA *et al.*, 2011).

2.1.1.2 Nanotecnologia nos alimentos

O rápido avanço da nanotecnologia tem possibilitado a inovação também na área alimentícia, no desenvolvimento de processos envolvidos na produção de alimentos, como trituração ou moagem, ou ainda na fabricação de embalagens ou no controle de qualidade (SOZER e KOKINI, 2009; MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2014).

Atualmente, a maioria dos alimentos consumidos é industrializada, e após a fabricação devem ser mantidos em embalagens por um tempo determinado até que sejam consumidos. Para isso, as embalagens precisam proteger os alimentos das variações de temperatura, umidade, sujeira, microorganismos, além de serem seguras, inertes e capazes de resistir a condições extremas durante o processamento ou envase (MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2014). Nanopartículas constituídas de polímeros, por exemplo, são usadas em embalagens de alimentos, sendo os principais polímeros usados polipropileno, polietileno, polivinil, entre outros (CHELLARAM *et al.*, 2014). Estas estruturas apresentam vantagens nos atributos mecânicos, uma vez que é possível controlar a porosidade das embalagens por meio do domínio das respectivas propriedades (DUNCAN, 2011). Outro exemplo a ser citado é a utilização de nanopartículas de ouro no controle da validade. Trata-se da adição de nanosensores que mudam de cor ou emitem fluorescência na presença de oxigênio ou patógenos no interior das embalagens (SOZER e KOKINI, 2009; DUNCAN, 2011).

2.1.1.3 Nanotecnologia em cosméticos

Milhões de consumidores usam diariamente diversos produtos de higiene pessoal e cosméticos (NOHYNEK *et al.*, 2010), e atualmente, grande parte destes produtos já contém nanopartículas na sua formulação. Alguns exemplos podem ser citados como: (i)

nanopartículas de dióxido de silício na formulação de cremes anti-idade (MIHRANYAN *et al.*, 2012); (ii) fulerenos na preparação de cremes usados no clareamento de manchas e também como anti-envelhecimento (BENN *et al.*, 2011; MIHRANYAN *et al.*, 2012); (iii) protetores solares com nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco (NOHYNEK *et al.*, 2010; MIHRANYAN *et al.*, 2012; LEWICKA *et al.*, 2013).

No entanto, o emprego da nanotecnologia em cosméticos não se restringe apenas as formulações, sendo usada também nas embalagens e nos equipamentos usados na fabricação. A utilização desta tecnologia nas embalagens visa especialmente impedir a contaminação microbiana, utilizando para isso nanopartículas com conhecida atividade antimicrobiana, como nanopartículas de prata (DUNCAN, 2011) ou óxido de magnésio, ou ainda para aumentar o período de vida útil do produto, com estruturas que ao serem incorporadas nas embalagens impedem a passagem de ar e umidade, como montmorilonita, um silicato mineral (MIHRANYAN *et al.*, 2012). Já a utilização da nanotecnologia nos equipamentos utilizados na fabricação dos cosméticos passa despercebida pelos consumidores. No entanto, com o intuito de oferecer benefícios para o processo de produção, isso aumenta as chances da presença das nanopartículas nos produtos finais (MIHRANYAN *et al.*, 2012).

2.1.1.4 Nanotecnologia em tecidos

Tecidos com modificações da superfície podem adquirir novas propriedades mantendo o conforto e resistência, podendo ser esta modificação para fins funcionais ou estéticos. Acabamentos estéticos são utilizados para modificar a aparência ou textura de uma fibra ou tecido, e os acabamentos funcionais têm como objetivo proporcionar maior resistência e/ou durabilidade (FOUDA *et al.*, 2013). Um exemplo desta modificação é a utilização de nanopartículas de dióxido de silício como acabamento hidrofóbico em tecidos, tornando-os assim impermeáveis (XUE *et al.*, 2009).

Roupas e materiais têxteis consistem em meios de fácil crescimento de fungos e bactérias, e uma forma de reduzir o risco de contaminação é a utilização de nanopartículas com função antimicrobiana. Neste sentido, nanopartículas de prata vem sendo utilizadas na fabricação e/ou modificações de tecidos, uma vez que

apresentam propriedades antimicrobianas (SIMONCIC e TOMSIC, 2010).

2.1.1.5 Nanotecnologia na terapêutica, diagnóstico e prevenção

O emprego da nanotecnologia para aplicações farmacêuticas e biomédicas inclui biossensores, ressonância magnética, detecção óptica, sistemas de entrega de substâncias, entre inúmeras outras aplicações (LINKOV *et al.*, 2009; VENKATARAMAN *et al.*, 2011). O avanço desta tecnologia vem mudando o cenário científico em termos de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (SINGH e LILLARD JR, 2009). Ao longo dos últimos 20 anos, observam-se também avanços no desenvolvimento da medicina personalizada e diagnóstico molecular em função da nanotecnologia (SAHOO *et al.*, 2007).

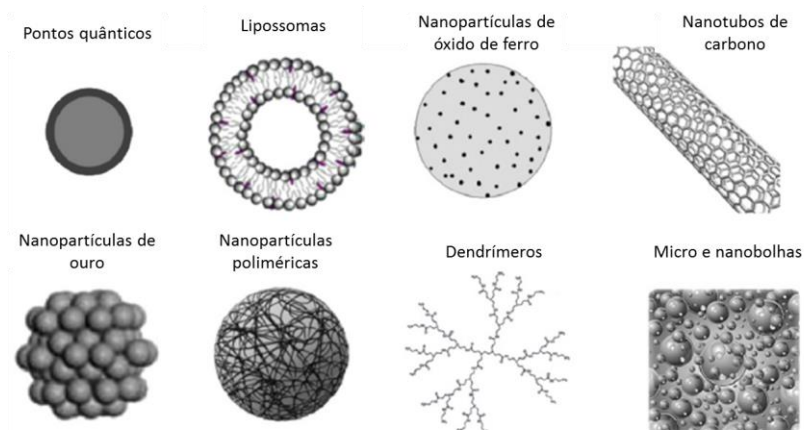
Desde que emergiu no início de 1970, os sistemas de entrega ou liberação de fármacos, do inglês “drug delivery systems”, baseados em sistemas nanoestruturados vem atraindo grande atenção dos cientistas. A principal vantagem desta abordagem é a potencial multifuncionalidade que apresenta o que permite integrar a terapêutica, por meio da incorporação de fármacos juntamente com o aprimoramento das técnicas de diagnóstico, desenvolvendo assim tratamentos personalizados, com aumento da eficácia e segurança (FANG e ZHANG, 2010). Um exemplo é o trabalho publicado por Liong e colaboradores (2008), que sintetizaram nanopartículas híbridas de óxido de ferro superparamagnéticas recobertas com nanopartículas de sílica, funcionalizadas com isocianato de fluoresceína e ácido fólico, contendo dois quimioterápicos, camptotecina ou paclitaxel. O intuito desse trabalho foi demonstrar a possibilidade de criar um nanocarreador capaz de ser detectado pelas técnicas de fluorescência e ressonância magnética, além de apresentar alta seletividade para as células tumorais, liberando os fármacos de maneira satisfatória no local desejado (LIONG *et al.*, 2008).

Os sistemas de entrega ou liberação de fármacos são projetados com a finalidade de carregar os fármacos para um local específico, na quantidade e pelo período de tempo desejado, e têm sido planejados no intuito de superar as deficiências das formulações convencionais (QIU e PARK, 2001). No momento, o desafio é o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos mais inteligentes, capazes de detectar e responder diretamente as condições fisiopatológicas, maximizando, dessa forma, a eficiência dos tratamentos (STEICHEN *et al.*, 2013).

Para serem utilizados como carreadores de fármacos e chegar ao sítio de ação de forma íntegra, os sistemas nanoestruturados devem ser capazes de permanecer na corrente sanguínea por um período mínimo de tempo antes de serem eliminados (HAUERT e BHATIA, 2014). Nanopartículas sem modificações da superfície são facilmente capturadas pelo sistema reticuloendotelial (SER), um sistema constituído por células do sistema imune situadas em diferentes locais do organismo e especializado em fagocitose (MOGHIMI *et al.*, 2001). Para impedir este problema, as nanopartículas podem ser revestidas com polímeros hidrofílicos, que as protege ou dificulta o reconhecimento pelos macrófagos (GAUR *et al.*, 2000; MOGHIMI e SZE BENI, 2003).

As nanopartículas podem ser classificadas primariamente entre sistemas nanoestruturados orgânicos e inorgânicos. Nanopartículas poliméricas, lipídicas, lipossomas, dendrímeros e nanocristais são considerados sistemas nanoestruturados orgânicos por terem moléculas orgânicas como componentes principais nas formulações, podendo ainda ser conjugados a um sistema nanoestruturado ou componente inorgânico, sendo então nomeados sistemas híbridos (FARAJI e WIPF, 2009). Por sua vez nanopartículas inorgânicas podem ser definidas como partículas de óxido de metal ou de composição metálica, tendo como exemplos os sistemas nanoestruturados preparados com dióxido de titânio, óxido de ferro, prata, ouro, entre outros (FADEEL e GARCIA-BENNETT, 2010). A Figura 1 apresenta exemplos de nanopartículas orgânicas e inorgânicas como nanopartículas de ouro, lipossomas, nanotubos de carbono, dendrímeros, entre outros (RE *et al.*, 2012).

Figura 1. Nanopartículas orgânicas e inorgânicas.



Adaptado de Re, Moresco e Masserini, 2012.

De acordo com a natureza das nanopartículas, estas podem ainda ser classificadas como “duras” ou “macias”, do inglês *hard* e *soft*. Nanopartículas do tipo duras correspondem àquelas feitas de material inorgânico e que mantêm as propriedades como forma e tamanho, independente das condições biológicas. Já as partículas do tipo macias são aquelas feitas de material orgânico, que podem sofrer alterações em propriedades como tamanho e carga de acordo com alterações do meio como pH e pressão (DÍAZ-MOSCOSO, 2012).

Por fim, nanopartículas podem ainda ser classificadas dependendo da natureza das partículas, podendo ser de origem natural, resultado, por exemplo, de reações químicas na atmosfera, erupções vulcânicas ou derivadas de combustão, ou desenvolvidas e produzidas pelo homem, como dendrímeros e nanotubos de carbono (HAM *et al.*, 2012).

2.2 Nanotoxicologia e os estudos de toxicidade

Com o desenvolvimento e aplicação da nanotecnologia nas mais diversas áreas, cresce também o número de produtos contendo nanopartículas e conseqüentemente a sua produção (DONALDSON *et al.*, 2004b). A pele, pulmão e trato gastrointestinal estão em contato direto com o meio ambiente, sendo consideradas as formas mais favoráveis de entrada das nanopartículas no corpo, além de implantes e

injeções (BUZEA *et al.*, 2007). Sabe-se que características como tamanho e forma podem favorecer ou facilitar o deslocamento das partículas no sistema circulatório e linfático, podendo alcançar tecidos e órgãos, desencadeando por sua vez danos irreversíveis (DONALDSON *et al.*, 2004b; BUZEA *et al.*, 2007). Assim, a nanotoxicologia, considerada um novo ramo da toxicologia, aborda aspectos relacionados com os efeitos adversos causados por nanopartículas (BUZEA *et al.*, 2007), efeitos estes considerados não usuais e não identificados quando se trata de partículas maiores, com tamanho acima de 1000 nm (SHINDE *et al.*, 2012). A nanotoxicologia surgiu recentemente, alguns anos após o surgimento da nanotecnologia, quando vários materiais em escala nanométrica já haviam sido introduzidos em muitos produtos e processos industriais (DONALDSON *et al.*, 2004a).

Muitos anos após ter sido dita, a famosa frase de Paracelsus "a diferença entre o remédio e o veneno é a dose" ainda é um conceito chave na toxicologia (LISON *et al.*, 2014). Com base neste princípio, toxicologistas concluem que não há nenhum produto químico e/ou medicamento seguro, uma vez que todos os produtos químicos e/ou fármacos são tóxicos sob certas condições de exposição. A distinção entre uma dose segura ou tóxica de um determinado composto vai depender do limite entre a dose mínima sem efeitos adversos e a dose capaz de produzir algum efeito (ROZMAN e DOULL, 2001; ROZMAN *et al.*, 2010).

A definição de dose para nanopartículas é um processo dinâmico, não trivial e menos comparável com outras partículas. Nanopartículas podem sofrer agregação, difusão, e o movimento e deposição em fluidos biológicos depende de propriedades como tamanho, forma e carga (TEEGUARDEN *et al.*, 2007; LISON *et al.*, 2014). Assim, nanopartículas podem sofrer modificações quanti e qualitativas antes mesmo de interagirem com micro e macromoléculas celulares.

De maneira geral, dose é definida como a quantidade de um agente que entra em contato com um alvo biológico, como consequência da exposição. Já a métrica é uma forma de expressar a dose, um padrão de medição, que para a nanotoxicologia pode ser expressa como $\mu\text{g/ml}$, cm^2/ml , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ou número de partículas/ml (LISON *et al.*, 2014).

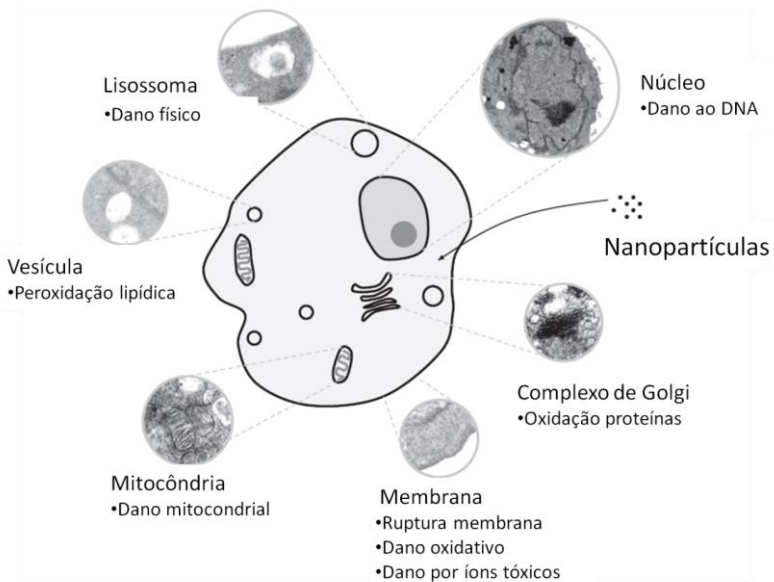
A identificação dos riscos quanto à utilização de sistemas nanoestruturados representa uma questão complexa. Segundo Linkov e colaboradores (2009), uma vez que as nanopartículas encontram-se dentro das células, quatro mecanismos distintos podem estar envolvidos com os efeitos deletérios da interação entre estruturas exógenas com as subestruturas celulares ou macromoléculas. O primeiro mecanismo é

baseado na liberação de componentes químicos a partir do sistema nanoparticulado, como por exemplo, a liberação de íons. O segundo mecanismo está relacionado ao tamanho e forma das partículas, os quais podem gerar impedimento estérico da ligação de macromoléculas a locais específicos nas células. O terceiro mecanismo de toxicidade baseia-se nas propriedades da superfície do material, tais como as propriedades fotoquímicas, densidades de carga, campo elétrico e condutância semi-eletrônica. O quarto e último mecanismo envolve a capacidade das nanoestruturas em atuar como vetores para o transporte de outros produtos químicos ou mesmo impurezas, eventualmente tóxicos para tecidos sensíveis (LINKOV *et al.*, 2009).

Os mecanismos de interação entre nanopartículas e organismos vivos ainda não estão completamente compreendidos. O conhecimento científico sobre os mecanismos de interação células- nanopartículas têm-se expandido apenas nos últimos anos, porém, sabe-se que os sistemas nanoestruturados tem a capacidade de entrar nas células, seja por mecanismos ativos ou passivos. Ainda não é possível dizer quais as consequências da exposição prolongada aos materiais em escala nanométrica, para os humanos e para o meio ambiente, mesmo que determinados estudos considerem alguns sistemas nanoestruturados seguros do ponto de vista biológico (ELSAESSER e HOWARD, 2012). A Figura 2 mostra alguns dos possíveis efeitos deletérios causados às células após exposição e/ou interação com nanopartículas, podendo-se citar dano ao DNA, oxidação de proteínas, dano a membrana citoplasmática, dano mitocondrial, peroxidação lipídica, entre outros.

Neste sentido, estudar os mecanismos de nanotoxicidade é uma tarefa bastante desafiadora, visto que, partículas feitas com os mesmos materiais, mas com pelo menos uma diferença em uma das propriedades físico-químicas podem ter comportamento totalmente diferente em relação às células e organismos vivos (ELSAESSER e HOWARD, 2012).

Figura 2. Interação das nanopartículas com as células: alvos intracelulares e mecanismos de toxicidade.



Adaptado de Elsaesser e Howard (2012).

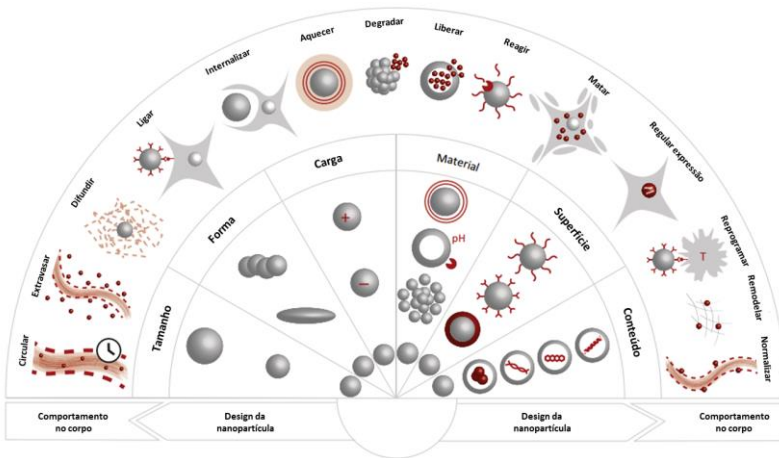
Com relação à nanotecnologia, o desenvolvimento de metodologias que determinem a toxicidade ou segurança de um sistema nanoestruturado ainda está sob desenvolvimento e depende de inúmeras variáveis. A complexidade aumenta quando se evolui de modelos *in vitro* para modelos *in vivo*. A determinação da toxicidade *in vivo* ainda está em fase inicial, entretanto as principais rotas de exposição já foram identificadas, entre estas estão incluídas: oral, respiratória, dérmica e parenteral (STERN e MCNEIL, 2008a). Adicionalmente, salienta-se que nanopartículas podem também penetrar profundamente nos tecidos, através de finos capilares, circular facilmente por todo o corpo e interagir com órgãos, tecidos e células (GAJEWICZ *et al.*, 2012). No entanto, estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos relacionados com essas interações, assim como a distribuição destas estruturas no corpo humano (ELSAESSER e HOWARD, 2012).

2.2.1 Propriedades físico-químicas dos sistemas nanoestruturados relacionados com a toxicidade

Para avaliação dos parâmetros toxicológicos de uma formulação de nanopartículas é necessário compreender e caracterizar o produto formado, caso contrário, os efeitos tóxicos encontrados podem ser facilmente atribuídos a uma determinada propriedade da partícula, a impurezas, ou ainda a outros componentes da formulação (BURLESON *et al.*, 2004; SAYES e WARHEIT, 2009). Dessa forma, é absolutamente necessário conhecer as propriedades físico-químicas dos materiais de partida (ELSAESSER e HOWARD, 2012).

Por meio de diferentes abordagens *in vivo* e *in vitro*, o tamanho das nanoestruturas tem mostrado influenciar no tempo de permanência na circulação, extravasamento, difusão intersticial, e habilidade em serem internalizadas pelas células (KIEVIT e ZHANG, 2011; DREADEN *et al.*, 2012). Estas propriedades podem impactar diretamente na toxicidade induzida pelas nanopartículas. Porém, segundo alguns autores, o tamanho das nanopartículas não é o único fator capaz de induzir toxicidade, sendo determinantes também aspectos como distribuição de tamanho, estado de aglomeração, forma, porosidade, área superficial, composição química, carga de superfície e estrutura cristalina (OBERDORSTER *et al.*, 2005; HAUERT e BHATIA, 2014). A Figura 3 ilustra a abrangência das aplicações de sistemas nanoestruturados bem como a importância das respectivas propriedades dependendo da aplicação e efeito que se deseja alcançar. Características como tamanho, forma, carga, material, tipo de funcionalização e conteúdo podem determinar a capacidade de sistemas nanoestruturados de internalizar, se ligar, aquecer, reagir e matar uma célula, tanto em humanos quanto em outros seres vivos.

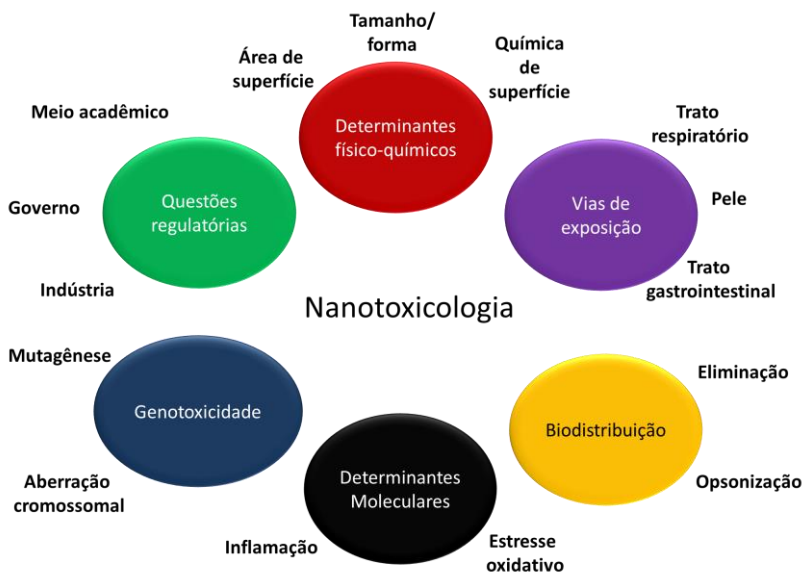
Figura 3. Propriedades e possíveis interações das nanopartículas com os sistemas vivos.



Adaptado de Hauert e Bhatia (2014).

Estudos têm demonstrado que a diminuição do tamanho de partícula aumenta a área da superfície da formulação, e quanto maior a área de superfície maior o número de grupos ativos, aumentando o potencial de interação biológica por unidade de massa (AITKEN *et al.*, 2004; MAYNARD *et al.*, 2006; WIESNER *et al.*, 2006). Nesse contexto, a nanotoxicologia engloba as propriedades físico-químicas das nanopartículas, mas também as possíveis rotas de exposição, biodistribuição, além de determinantes moleculares, genotóxicos e aspectos regulatórios, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4. Aspectos relacionados à nanotoxicologia.



Adaptado de Arora et al., (2012).

Apesar de não ser o único fator determinante na toxicidade, alguns autores já demonstraram que o tamanho das nanopartículas pode determinar o efeito *in vivo*. Segundo Shi e colaboradores, em um trabalho publicado em 2013, nanopartículas de prata com tamanho entre 5 e 10 nm exibem maior toxicidade para *Tetrahymena pyriformis*, um protozoário de água doce, quando comparado com nanopartículas de prata um pouco maiores, com no máximo 25 nm (SHI *et al.*, 2013). No trabalho publicado em 2012 por Jo e colaboradores, que avaliaram a toxicidade de nanopartículas de prata para um microcrustáceo marinho chamado *Daphnia magna*, a toxicidade destas estruturas foi influenciada por fatores como método de dispersão, filtração e também pelo tamanho (JO *et al.*, 2012). Ainda, dados publicados em 2011 por Hirn e colaboradores, mostraram o acúmulo de nanopartículas de ouro nos órgãos de camundongos após administração endovenosa. Com base nos resultados é possível concluir que o acúmulo de nanopartículas de ouro está diretamente relacionado com o tamanho, que resulta no aumento de quase 50% na taxa de acúmulo de estruturas com 200 nm quando comparado com as de 1,4 nm (HIRN *et al.*, 2011).

Os estudos que comparam os efeitos de diferentes tamanhos de uma mesma formulação de nanopartículas, preparada pelo mesmo método e com os mesmos componentes demonstram que o tamanho destas estruturas pode influenciar na atividade biológica. Portanto, nanocarreadores não podem ser vistos apenas como carreadores passivos de uma substância, mas como possíveis moduladores de repostas biológicas e toxicológicas (FADEEL e GARCIA-BENNETT, 2010).

Estudos tem comparado também o efeito da carga de superfície e da forma das partículas na interação com as células e organismos vivos. Segundo dados publicados por Wang e colaboradores, nanopartículas carregadas positivamente são rapidamente capturadas pelas células, o que desencadeia reações imunes significativas (WANG *et al.*, 2012). Em um trabalho publicado em 2010 por He e colaboradores, os autores avaliaram os efeitos da alteração da carga de superfície de nanopartículas de quitosana na captação e biodistribuição destas estruturas por diferentes linhagens celulares. Com base nesses resultados, é possível dizer que a carga na superfície das nanopartículas pode determinar a captação pelas células, assim como a biodistribuição após administração pela via endovenosa (HE *et al.*, 2010).

Com relação à forma das nanopartículas, Peng e colaboradores (2011) demonstraram o efeito da morfologia de nanopartículas de zinco para algas marinhas. Neste trabalho, nanopartículas na forma de bastão demonstraram maior toxicidade para a espécie *Phaeodactylum tricorutum* do que as partículas do mesmo material na forma esférica (PENG *et al.*, 2011). O mesmo ocorre com nanopartículas de ouro, como demonstrado por Wang e colaboradores (2008). Estes autores avaliaram a toxicidade de nanopartículas de ouro na forma esférica e de bastão usando uma linhagem de células derivadas de queratinócitos humanos (HaCaT). Quando na forma esférica, as nanopartículas não demonstraram efeito tóxico para esta linhagem, porém, na forma de bastão, a viabilidade das células diminuiu em torno de 70% (WANG *et al.*, 2008). Da mesma forma, a morfologia de nanopartículas lipídicas também está diretamente relacionada com a capacidade citotóxica. Petersen e colaboradores (2011) demonstraram que nanopartículas lipídicas preparadas com os mesmos componentes usando métodos diferentes, resultaram em amostras na forma esférica, de bastão e cilíndrica. As nanopartículas com mesmo tamanho e composição, porém com formas diferentes, causaram diferentes respostas quando incubadas com as células. A concentração de nanopartículas capaz de matar 50% de fibroblastos de tecido conectivo de camundongo (L929) foi de aproximadamente 1 mg/ml quando na forma esférica, caindo para 1

µg/ml na forma de bastão, ou seja, um aumento de mil vezes na capacidade citotóxica, apenas com alterações na forma física (PETERSEN *et al.*, 2011).

2.2.2 Modelos para caracterizar a toxicidade de materiais nanoestruturados

2.2.2.1 Estudos *in vitro*

Os modelos utilizados nos estudo *in vitro* consistem em um meio rápido e eficiente para avaliar uma série de parâmetros toxicológicos relacionados com nanopartículas, e permitem também o desenvolvimento de mecanismos e metodologias para essa determinação, fornecendo informações sobre as diversas formas de interação entre nanopartículas e células humanas e de animais (DHAWAN e SHARMA, 2010; ARORA *et al.*, 2012). Esses estudos podem ser utilizados para predizer os efeitos das nanopartículas para as células, além de estabelecer uma relação concentração-efeito e estrutural-atividade. Com estes ensaios é possível uma primeira avaliação, especialmente pela grande demanda na produção (ARORA *et al.*, 2012) minimizando assim a utilização de animais (MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2009).

As vantagens na utilização dos estudos *in vitro* são:

- Evidenciar os efeitos primários na interação célula-nanopartícula;
- Identificar os mecanismos primários de toxicidade na ausência dos fatores fisiológicos;
- Baixo custo, rapidez e alta eficiência;
- Aprimoramento das propriedades físico-químicas das estruturas antes de iniciar os estudos *in vivo* (HUANG *et al.*, 2010).

Atualmente no Brasil não há uma legislação que determine quais ensaios devem ser utilizados para garantir a segurança na utilização e/ou fabricação de partículas em escala nanométrica. A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, elaborou recentemente um diagnóstico institucional sobre nanotecnologia e já começa a discutir a necessidade de uma regulamentação brasileira para utilização de materiais na escala nanométrica. Uma alternativa para essa falta de regulamentação é a utilização de guias desenvolvidos por órgãos como o FDA (US Food

and Drug Administration), um órgão governamental dos Estados Unidos da América, ou órgãos como OECD (The Organization for Economic Co-operation and Development), uma organização internacional de alguns países como Japão, Alemanha, Grécia, entre outros (OECD, 2012).

Existem muitos ensaios considerados clássicos na determinação da viabilidade e/ou citotoxicidade de células em cultura. Estes ensaios são considerados relativamente simples e consistem em métodos espectrofotométricos que utilizam marcadores para determinar a viabilidade celular por meio da avaliação da integridade da membrana plasmática, como o ensaio com azul de tripan e da lactato desidrogenase, ou atividade metabólica, como MTT e alamar blue. Porém, quando se trata de nanoestruturas, é preciso levar em consideração que alguns ensaios podem não se adequar a este propósito, o que culminaria em resultados errôneos. Um exemplo são trabalhos recentes que têm demonstrado que nanopartículas metálicas como nanotubos de carbono, dióxido de titânio e nanopartículas de prata interferem em ensaios de viabilidade como MTT, XTT e LDH, reduzindo o MTT e XTT ou inativando a enzima LDH, respectivamente, culminando em um falso resultado (WANG *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011).

Muitos estudos sugerem que as respostas biológicas causadas por nanopartículas podem estar relacionadas com a entrada e acúmulo intracelular destas estruturas (BELADE *et al.*, 2012). A entrada de um agente tóxico na célula é um passo crítico que normalmente determina seu efeito deletério (MUÑOZ e COSTA, 2012).

Segundo Sun e colaboradores (2011), a toxicidade causada por nanopartículas de sílica em células de hepatoma humano (HepG2) está diretamente relacionada com a entrada e acúmulo nas mitocôndrias, gerando estresse oxidativo seguido de morte celular por apoptose. Nesse trabalho, a entrada e localização das nanopartículas no interior das células foram determinados por meio da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (SUN, L. *et al.*, 2011).

A utilização da microscopia não se limita apenas à identificação da entrada e acúmulo das nanopartículas na célula, mas também na avaliação da interação deste tipo de estrutura com as membranas celulares. Segundo Elsaesser e colaboradores (2012), a estabilidade da membrana celular pode ser afetada por nanopartículas de forma direta, por meio de dano físico, ou de forma indireta, por meio de estresse oxidativo, e em ambos os casos, essa interação pode culminar em morte celular (ELSAESSER e HOWARD, 2012). Gopinath e colaboradores

(2010) utilizaram a microscopia de força atômica (AFM) para avaliar o efeito de nanopartículas de prata incubadas com células de rins de hamster (BHK21) e células de adenocarcinoma de colo humano (HT29). Utilizando um microscópio capaz de avaliar as células em tempo real, os autores demonstraram a capacidade das nanopartículas em alterar drasticamente a morfologia da membrana celular, evidenciando diretamente a toxicidade da formulação (GOPINATH *et al.*, 2010).

Na presença de agentes estressores a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta no interior das células, o que pode culminar na ativação de mediadores pró-inflamatórios, possivelmente via estresse oxidativo (PAUR *et al.*, 2011). Apesar do grande número de técnicas disponíveis atualmente para quantificação de citocinas, o imunoenensaio (ELISA) continua sendo um dos métodos mais utilizados. Trata-se de um ensaio imunoenzimático que permite a quantificação de forma simples e precisa de marcadores inflamatórios em sobrenadantes de cultura de células por meio de anticorpos e reações de detecção enzimática (KROLL *et al.*, 2009). Esse método foi descrito pela primeira vez em 1971 (LEQUIN, 2005) e tem sido amplamente utilizado na avaliação da toxicidade de nanopartículas de diferentes composições como dióxido de titânio e carbono (HUSSAIN *et al.*, 2009), sílica (PARK e PARK, 2009), óxido de cobre (COHEN *et al.*, 2013), entre outros. As citocinas mais comumente avaliadas são (IL-8), seguido por TNF- α e IL-6 (KROLL *et al.*, 2009). É considerado um ensaio de fácil implementação, com reagentes não radioativos e de fácil acesso (OSUCHOWSKI *et al.*, 2005).

2.2.2.2 Estudos *in vivo*

Apesar das vantagens na utilização dos estudos *in vitro*, estes não descartam a necessidade dos estudos *in vivo*. Por meio dos estudos *in vivo* é possível prever a toxicidade de nanoestruturas para os seres humanos, além dos efeitos crônicos pela exposição ou aspectos relacionados à farmacocinética, o que seria impossível utilizando apenas os métodos *in vitro*. Segundo Hoet e colaboradores (2004), a identificação dos perigos relacionados à exposição às nanoestruturas *in vivo* depende muito da via de exposição, dose, susceptibilidade do organismo estudado e das respectivas propriedades físico-químicas (HOET *et al.*, 2004).

A interação das nanopartículas com a pele tem sido amplamente estudada por conta do avanço na utilização da nanotecnologia em

produtos que estarão em contato direto com a pele como tecidos, cosméticos e protetores solares. Estes estudos têm sido realizados na tentativa de prever o efeito da interação da pele com nanopartículas como, por exemplo, de dióxido de titânio, que pela conhecida capacidade de absorver a radiação ultravioleta, são amplamente utilizadas na fabricação de protetores solares (SCHULZ *et al.*, 2002; GAMER *et al.*, 2006; VAN DER MERWE *et al.*, 2009).

O sistema respiratório é uma das principais rotas de entrada de materiais particulados no corpo humano devido à entrada constante e ininterrupta de ar pelos pulmões (PAUR *et al.*, 2011; ARORA *et al.*, 2012; ELSAESSER e HOWARD, 2012). Doenças pulmonares já foram descritas devido à toxicidade causada por substâncias como cobalto (NEMERY *et al.*, 1994), amianto (NYMARK *et al.*, 2008), silício (HUGHES *et al.*, 2001), e atualmente muitos pesquisadores tem se dedicado ao estudo dos efeitos de nanoestruturas para o trato respiratório (SAGER *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009; LIPKA *et al.*, 2010).

Nanopartículas podem ser liberadas no meio ambiente nos processos de combustão ou ainda nas atividades industriais relacionadas ao processo de produção de vários produtos (SEATON *et al.*, 2010). Uma vez no meio ambiente, essas partículas podem ainda sofrer modificações físicas e/ou químicas por interagirem com a luz, água e outras substâncias ambientais (PAUR *et al.*, 2011).

O trato gastrointestinal representa uma importante via de entrada de nanopartículas no corpo humano uma vez que estas têm sido utilizadas como aditivos alimentares ou na produção de embalagens (PEN, 2009; ELSAESSER e HOWARD, 2012). Lozano e colaboradores (2012) publicaram um artigo em que os autores investigaram a toxicidade aguda e subaguda causada por nanopartículas de carboneto de silício administradas pela via oral em ratos. Como resultado, os autores detectaram a presença das nanopartículas nas fezes e urina, o que é um indício da capacidade das mesmas de atravessar a barreira intestinal (LOZANO *et al.*, 2012).

Os estudos *in vivo* são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na interação de nanopartículas com organismos multicelulares complexos (SEATON *et al.*, 2010). Essa avaliação se faz necessária não apenas para as estruturas nanométricas usadas em aplicações industriais, em que a exposição humana poderia ocorrer por meio da liberação no meio ambiente, mas também para aquelas estruturas em que a exposição acontece por conta da sua aplicação, em medicamentos ou dispositivos para o diagnóstico de doenças (SEATON *et al.*, 2010; ELSAESSER e HOWARD, 2012).

Pequenos mamíferos têm sido utilizados como modelos para avaliar os efeitos tóxicos e os mecanismos envolvidos na toxicidade de nanopartículas para os humanos. Por terem grande homologia entre os genomas de mamíferos, estes animais são usados comumente em modelos de doenças e no estudo de possíveis candidatos a fármacos (RUSSELL, 1991). Fako e colaboradores (2009) relataram que ratos e cães são comumente usados em estudos de toxicidade, enquanto camundongos são usados como modelo de efeito e atividade. Outro modelo bastante promissor para estes estudos é um peixe conhecido como peixe-zebra (*Danio rerio*), que segundo os autores, é uma espécie que possui grande homologia com o genoma humano (FAKO e FURGESON, 2009).

Organismos como bactérias, algas e fungos também tem sido usados como modelos para o estudo da toxicidade de nanopartículas. O efeito tóxico de nanopartículas de zinco para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* mostrou estar relacionado com o tamanho das partículas, com aumento da atividade antibacteriana proporcional a diminuição do tamanho das partículas avaliadas (NAIR *et al.*, 2009). Já a liberação de íons parece ser um dos mediadores da toxicidade causada por nanopartículas metálicas em algas. Em um trabalho publicado em 2008, Navarro e colaboradores avaliaram os efeitos de nanopartículas de prata para *Chlamydomonas reinhardtii*, um tipo de alga verde unicelular, e demonstraram diminuição da capacidade de fotossíntese mediada pela liberação de íons prata, assim como pela interação alga-nanopartícula (NAVARRO *et al.*, 2008).

Independentemente dos modelos utilizados para avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, deve-se ter em mente que por se tratar de uma nova tecnologia, é necessário atenção a resultados inesperados ou ainda não descritos na literatura. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, a toxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi avaliada *in vivo*, em camundongos Swiss. Apesar de muitos artigos despreverem este tipo de partícula como genuinamente biocompatível, uma vez que a composição da formulação é basicamente de lipídios, após administração intraperitoneal da formulação obtivemos um resultado inesperado e nunca antes publicado. No momento em que os animais foram mortos para retirada dos órgãos e avaliação de parâmetros relacionados à toxicidade, pôde-se observar macroscopicamente o acúmulo de gordura na região abdominal e epididimal dos animais, mesmo sem um aumento no peso total. Este resultado poderia ter sido descartado e estas partículas serem consideradas não tóxicas caso

fossem levados em consideração apenas os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, que por sua vez não sofreram alterações. Com base neste achado, uma avaliação histológica da gordura foi realizada, em que se identificou infiltrado inflamatório no tecido (SILVA *et al.*, 2013a). Outros ensaios são necessários para determinar os mecanismos relacionados ao efeito inflamatório, entretanto, este exemplo evidencia a necessidade de uma abordagem mais ampla quando se trata da avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados.

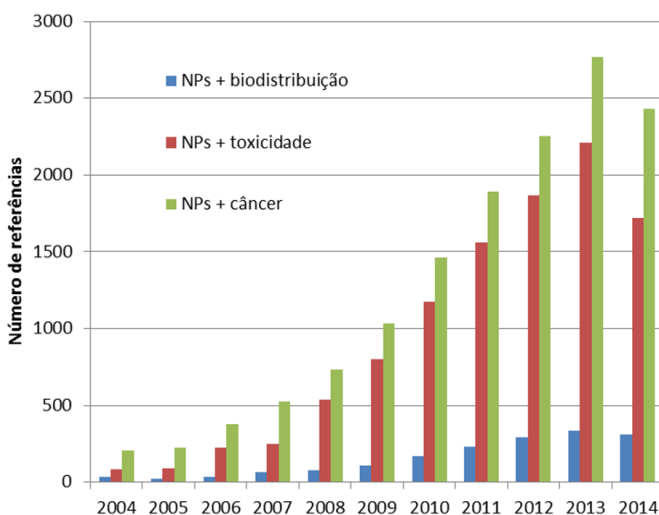
2.2.2.3 Estudos *ex vivo*

Atualmente, grande parte dos resultados obtidos experimentalmente *in vitro* precisam ser validados e confirmados *in vivo*, utilizando pra isso animais (PAUL *et al.*, 2013). Segundo a política da União Europeia, existe a necessidade de mudança urgente no que diz respeito à avaliação da segurança e toxicidade de substâncias e produtos químicos, com o desenvolvimento de novas metodologias que dispensem ou diminuam o uso de animais. Além disso, segundo Reus, Usta e Krul (2012), os estudos usando animais são caros e já proibidos em lugares como Europa, inclusive para avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos de produtos para cuidados pessoais (REUS *et al.*, 2012). Assim, os ensaios *ex vivo* tem se tornado uma ferramenta promissora para avaliação da toxicidade de forma geral. Em um trabalho publicado recentemente, o estudo da permeação de nanopartículas de poliestireno com potencial aplicação como carreador de fármacos para uso ocular, foi avaliado usando humor vítreo bovino (XU *et al.*, 2013). De forma similar, a permeação intestinal de nanopartículas lipídicas foi avaliada usando parte do intestino de ratos (NEUPANE *et al.*, 2014). Em ambos os estudos é possível utilizar tecidos ou parte de tecidos de animais já sacrificados e que teoricamente não teriam mais utilidade do ponto de vista experimental (NEUPANE *et al.*, 2014). Ainda, modelos de epiderme humana já são comercializados e usados como modelo para identificar potencial toxicidade de produtos farmacêuticos, como já descrito por muitos autores (BERNARD *et al.*, 2000; PORTES *et al.*, 2002; LELIEVRE *et al.*, 2007). Os ensaios para avaliação de citocinas, em que sangue humano ou de animais é exposto a uma substância, também tem provado ser uma ferramenta importante para avaliar as respostas celulares (RAY *et al.*, 2006).

2.2.2.4 Estudos *in silico*

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos voltados ao estudo da biodistribuição, toxicidade e aplicações de nanopartículas. A Figura 5 mostra o crescimento na pesquisa voltado a essa área do conhecimento no período de 2004 a 2014. Esses estudos tem propiciado uma melhor compreensão das propriedades responsáveis pelos efeitos dos sistemas nanoestruturados, mas também representam um desafio pela variedade de materiais, métodos de preparação e modificação de superfícies já disponíveis ou ainda em desenvolvimento. Somados a isso, as diferenças nas propriedades das nanopartículas e nos modelos experimentais dificultam ainda mais a comparação entre estudos similares. Dessa forma, novas estratégias têm sido criadas para avaliar a toxicidade de sistemas nanoestruturados em organismos vivos (LI *et al.*, 2010).

Figura 5. Número de publicações relacionadas à biodistribuição, toxicidade e aplicação das nanopartículas (NPs) nos últimos anos, segundo a base de dados PubMed.



Modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (do Inglês, physiologically based pharmacokinetic model – PBPK) combinam equações matemáticas para descrever os processos anatômicos,

fisiológicos e moleculares que regulam a farmacocinética de moléculas ou fármacos, com dados *in vitro* e ou *in vivo*, objetivando simular e prever a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) (LI *et al.*, 2010; MOSS e SICCARDI, 2014).

Vários processos estão envolvidos na distribuição de nanopartículas no corpo humano, e a farmacocinética das mesmas pode diferir substancialmente das formulações tradicionais, o que dificulta o desenvolvimento de modelos farmacocinéticos (PBPK) para sistemas nanoestruturados. A utilização de modelos farmacocinéticos (PBPK) para este tipo de predição surgiu apenas em 2006 e segundo a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) trata-se de uma promissora e valiosa ferramenta para o prognóstico dos riscos decorrentes da utilização de nanoestruturas *in vivo* (LI *et al.*, 2010).

O principal desafio para o desenvolvimento de um modelo farmacocinético que prediga a distribuição e acúmulo de nanopartículas *in vivo* é estimar quais e como as respectivas propriedades físico-químicas poderão influenciar nos organismos. Abordagens experimentais *in vitro* têm sido desenvolvidas recentemente para descrever a interação entre nanopartículas e diferentes populações de células, o que representa uma importante ferramenta para estimar a distribuição de nanopartículas, sendo esses resultados integrados a modelagem farmacocinética (PBPK) (MOSS e SICCARDI, 2014).

Com base no exposto acima, nosso grupo iniciou um estudo de toxicidade de nanopartículas, avaliando as propriedades físico-químicas e os mecanismos envolvidos nos respectivos efeitos tóxicos, usando modelos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico*, este último para predição do acúmulo e distribuição de nanopartículas *in vivo*. Nesta oportunidade, os resultados obtidos serão apresentados e discutidos em capítulos de acordo com o sistema nanoestruturado avaliado, que foram nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NPs), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONS) e nanopartículas de poliuretano (PU-NPs). TiO₂-NPs foram escolhidos para avaliação *in vivo* tendo em vista os resultados obtidos previamente, durante o curso de mestrado em farmácia realizado nesta universidade. Nesta oportunidade avaliou-se o efeito causado pelo tratamento de camundongos com TiO₂-NPs nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Com base nestes resultados, optamos por dar continuidade a este estudo, avaliando outros parâmetros relacionados com a toxicidade. SPIONS foram também objeto deste estudo tendo em

vista a promissora utilização deste tipo de sistema nanométrico no tratamento de câncer por meio de hipertermia. De maneira similar, PU-NPs aqui avaliados foram projetados e sintetizados para o carregamento de fármacos. Porém, para aplicação de ambas as formulações de nanopartículas, seja no tratamento por hipertermia ou como sistemas de carregamento de fármacos, faz-se necessário a avaliação da toxicidade *in vivo*.

CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE
DIÓXIDO DE TITÂNIO
(TiO₂-NPs)

1. Introdução

TiO₂-NPs estão presentes em uma série de produtos como protetores solares, cosméticos, tintas, papel, aditivos farmacêuticos e alimentares (LEWICKA *et al.*; DAUGHTON e TERNES, 1999; JIN *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; NOHYNEK *et al.*, 2010; LEWICKA *et al.*, 2013). Trata-se de um pó branco e inodoro, capaz de absorver a radiação UV e refletir a luz visível, existindo naturalmente nas formas cristalina anatase, rutilo e brokita. Atualmente é empregado em 70% de todo o pigmento produzido no mundo (CHEN *et al.*, 2014).

É um dos materiais mais estudados quanto à toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Segundo a base de dados PubMed, consultada no dia 30 de setembro de 2014, dos 8.967 artigos publicados sobre toxicidade de nanopartículas, em torno de 10% destes discutem a toxicidade de TiO₂-NPs. Segundo estes artigos, este material quando em tamanho nanométrico é capaz de induzir estresse oxidativo e gerar dano mitocondrial *in vitro*, em células gliais (HUERTA-GARCÍA *et al.*, 2014), induzir comportamento depressivo em ratos nascidos de mães expostas as partículas durante a gestação (CUI *et al.*, 2014), causar genotoxicidade em células de epitélio gástrico humano (BOTELHO *et al.*, 2014), entre outros efeitos. Apesar dos resultados já publicados, é possível que os efeitos deste material sejam ainda subestimados por conta de interferências nos ensaios de toxicidade comumente usados por muitos pesquisadores.

De acordo com resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), verificamos que TiO₂-NPs parecem estimular a proliferação de células de fibroblasto utilizando os ensaios de viabilidade celular baseado nos reagentes MTT e vermelho neutro, resultado que comprovamos ser falso, utilizando outra técnica. Mostramos que a quantidade de DNA não aumentava, ou seja, se as células estivessem proliferando, a concentração de DNA deveria aumentar. Concluiu-se que a redução do MTT não era realizada pelas células. Neste sentido, Wang e colaboradores (2011) relataram que os ensaios de MTT e XTT podem sofrer interferência com TiO₂-NPs pela formação de radicais superóxido, que por sua vez reduzem o sal de tetrazólio, gerando como resultado um falso aumento da viabilidade celular (WANG *et al.*, 2011). O mesmo acontece com nanopartículas metálicas e o ensaio de viabilidade que mede a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio extracelular como forma de avaliar o dano as membranas das células. Estes autores demonstram

que nanopartículas metálicas inativam a LDH, o que implica em um falso resultado de viabilidade (HAN *et al.*, 2011).

Ainda de acordo com resultados preliminares, obtidos e publicados em dissertação de mestrado, a administração intraperitoneal de TiO₂-NPs, na dose de 2 mg/kg/dia, durante 10 dias, provocou alterações significativas em parâmetros bioquímicos, hematológicos e no peso do baço e rins de camundongos albinos tratados com as partículas, conforme mostrado na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3 (SILVA, 2011).

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos dos animais controle e tratados com 2 mg/kg/dia de TiO₂-NPs.

Parâmetros	Controle	TiO ₂ -NPs
ALT (UI/l)	111 ± 9	119 ± 9.2
AST (UI/l)	101 ± 10	140 ± 7,19*
Albumina (g/dl)	2,3 ± 0,05	2,3 ± 0,08
Proteína total (g/dl)	5,1 ± 0,19	5,2 ± 0,35
Uréia (mg/dl)	62 ± 5	47 ± 2,23
Creatinina (mg/dl)	0,5 ± 0,08	0,5 ± 0,01
Triglicerídeos (mg/dl)	97 ± 19	48 ± 5,75*
Colesterol Total (mg/dl)	91 ± 12	76 ± 7,55*

*p<0,05

Fonte: (SILVA, 2011)

Tabela 2. Peso dos órgãos dos camundongos controle e tratados com 2 mg/kg/dia de TiO₂-NPs.

Peso dos órgãos (g)	Controle	TiO ₂ -NPs
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*

* p ≤ 0.05

Fonte: (SILVA, 2011)

Tabela 3. Parâmetros hematológicos após tratamento com 2 mg/kg/dia de TiO₂-NPs.

Parâmetros	Controle	TiO₂-NPs
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 (%)	14,5 ± 2,1	17 ± 2
Mononuclear (%)	85,6 ± 3,1	74 ± 2*
Eosinófilo (%)	1 ± 1	1 ± 1
Basófilo (%)	2,5 ± 1	9 ± 1*

* p ≤ 0.05

Fonte: (SILVA, 2011)

Tendo em vista estes resultados, repetiu-se a administração intraperitoneal de TiO₂-NPs na dose de 2 mg/kg/dia, durante 10 dias, para avaliação do efeito destas partículas na variação de peso dos animais, índice de Lee, acúmulo de gordura abdominal, acúmulo de titânio nos órgãos, assim como avaliação histopatológica dos órgãos após o tratamento. A avaliação do efeito destas partículas no acúmulo de gordura abdominal deu-se por resultados prévios obtidos com nanopartículas lipídicas sólidas em que a administração intraperitoneal em camundongos albinos resultou em aumento da gordura abdominal dos animais quando comparados com os animais do grupo controle (SILVA *et al.*, 2013b).

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

As nanopartículas de dióxido de titânio foram cedidas pelo professor Dr. Ubirajara P. R. Filho, da USP de São Carlos, Brasil, tendo sido adquiridas da Sigma-Aldrich. Kits usados para avaliação *in vivo* dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram adquiridos da Labtest Diagnóstica SA, (Lagoa Santa, MG, Brazil); o ácido nítrico (HNO₃) foi adquirido da Kürner Analysentechnik (Rosenheim, Germany), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de alta pureza da Vetec (São

Paulo, Brazil) e árgon 99.996% da White Martins (São Paulo, Brazil); o paraformaldeído 4% foi adquirido da Sigma-Aldrich.

2.2 Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em colaboração com a pesquisadora Claudriana Locatelli da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) - Videira/SC, e com o pesquisador Celso Pilati da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O tratamento dos animais e a coleta das amostras foram realizados na UNOESC.

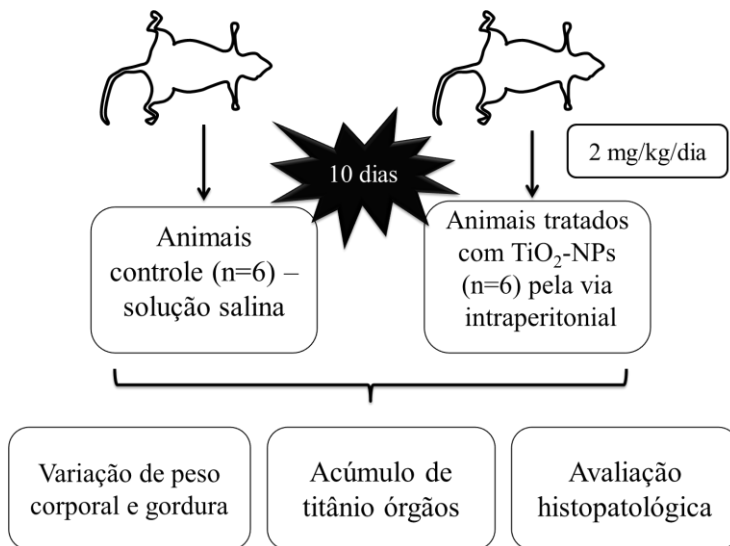
2.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos com idade de dois meses, fornecidos pelo biotério da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) - Videira/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 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNOESC, o qual foi aprovado sob parecer número 01/2012 (Anexo 1).

2.2.2 Tratamentos

Os animais foram tratados com TiO_2 -NPs com base no guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (425/2008), uma diretriz para investigação da toxicidade sistêmica oral de novas substâncias. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o peso, tendo em média de 30 a 40 gramas. Para avaliação dos efeitos de TiO_2 -NPs, os camundongos foram divididos em dois grupos de seis animais cada. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina e os animais tratados receberam a dose de 2 mg/kg/dia de TiO_2 -NPs, como mostrado na Figura 6, pela via intraperitoneal por 10 dias, uma vez ao dia.

Figura 6. Delineamento experimental para avaliação da toxicidade e/ou efeitos sub-crônicos após tratamento com TiO_2 -NPs.



2.2.3 Parâmetros de toxicidade

Os parâmetros avaliados após a administração de TiO_2 -NPs foram: variação de peso corporal, gordura visceral, epididimal e subcutânea, índice de massa corpórea, exame histopatológico e acúmulo de titânio nos órgãos. A adiposidade dos animais tratados com TiO_2 -NPs foi determinada pelo índice de Lee (raiz cúbica do peso do corpo em gramas dividido pelo comprimento naso-anal em milímetros multiplicado por 10^4) (BERNARDIS e PATTERSON, 1968). A avaliação do peso corporal foi realizada individualmente no início e ao término do tratamento. Após a eutanásia, o tecido adiposo da região visceral, epididimal e subcutânea, além do cérebro, pulmão, coração, rins, fígado, baço, estômago foram removidos, pesados e preparados para avaliação histopatológica. Para tal avaliação, amostras dos órgãos e tecidos foram fixados (paraformaldeído 4%), desidratados em álcool, inclusos em bloco de parafina e posteriormente cortados ($5\mu\text{m}$ diâmetro) e corados com hematoxilina e eosina. Cortes dos tecidos foram analisados em microscópio em aumento variando entre 100 e 400 vezes.

O acúmulo de titânio nos órgãos foi avaliado por ICP-MS. Para esta avaliação, amostras de cada órgão foram liofilizadas e pesadas diretamente em frascos de polifluor alcóxi (PFA). Na sequência foi adicionado ácido nítrico (HNO_3) purificado, água desionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA) e peróxido de hidrogênio de alta pureza (Vetec, São Paulo, Brasil) e a mistura foi submetida a um programa de digestão em forno de microondas (Milestone, Sorisole, Itália). As medições foram realizadas utilizando espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (NexION 300D - Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, Canadá); argônio 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado para formação do plasma e gás nebulizador. O ródio ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) foi utilizado como padrão interno e testes de recuperação foram realizados para confirmar a ausência de interferência espectral (recuperações obtidas foram de 92-114%).

2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão da média (DPM). Os resultados foram analisados usando GraphPad Prism 5 e análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

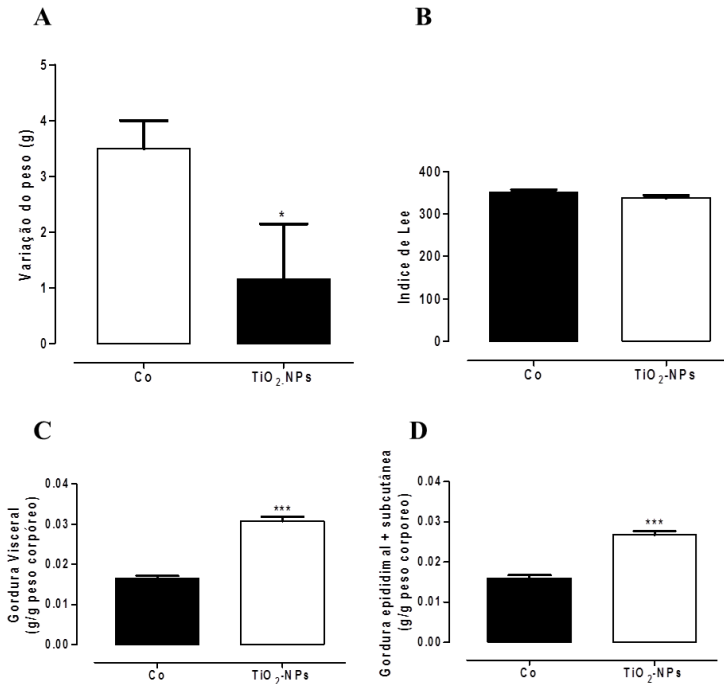
As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2 -NPs) objeto deste trabalho foram adquiridas da Sigma-Aldrich na forma de pó. Antes da sua utilização, as nanopartículas foram solubilizadas em água estéril na concentração de 10 mg/ml para caracterização quanto à forma, tamanho, composição e potencial zeta. De acordo com a caracterização realizada pelo grupo do Prof. Dr. Ubirajara, a suspensão de nanopartículas continha uma mistura de anatase e rutilo, duas das três formas cristalinas do titânio, na razão de 7 para 3, com partículas de diâmetro médio de 118 ± 30 nm, forma esférica e potencial zeta de -36,82 mV (dados não mostrados). Antes da caracterização assim como antes da administração nos animais, a suspensão de nanopartículas foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos.

TiO₂-NPs foi administrado pela via intraperitoneal por esta ser uma região do corpo altamente vascularizada. Além disso, a via intraperitoneal é uma das formas mais efetivas para avaliação dos efeitos da distribuição de substâncias em animais, em estudos de curto prazo. Todos os animais toleraram as injeções intraperitoneais de nanopartículas e nenhuma morte foi registrada durante o tratamento. Não foram observadas alterações comportamentais nos animais, assim como alterações no consumo de água e alimento.

Entre os parâmetros toxicológicos avaliados, foi analisada a variação de peso e adiposidade. Uma diminuição significativa no ganho de peso corporal foi observada em camundongos tratados com TiO₂-NPs (Figura 7-A), o que é considerado um dos primeiros indicativos de toxicidade *in vivo* (LOCATELLI et al., 2012). Com relação ao índice de Lee, que é considerado o índice de massa corpórea para camundongos, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratados (Figura 7-B). Com a diminuição na variação de peso dos animais tratados esperava-se uma diferença também no índice de Lee, porém por conta dos animais tratados apresentarem peso médio inicial maior do que os animais do grupo controle, não houve diferença significativa neste parâmetro.

No momento em que os animais foram mortos, observou-se um aumento macroscópico no acúmulo de gordura na região abdominal, o que se pôde confirmar pesando a gordura visceral, epididimal e subcutânea. Animais tratados com TiO₂-NPs apresentaram um aumento significativo de $0,0143 \pm 0,0006 \text{ gg}^{-1}$ na deposição de gordura visceral e $0,0108 \pm 0,0009 \text{ gg}^{-1}$ na deposição de gordura epididimal e subcutânea, em comparação com o grupo controle (Figura 7-C-D) ($p < 0,001$).

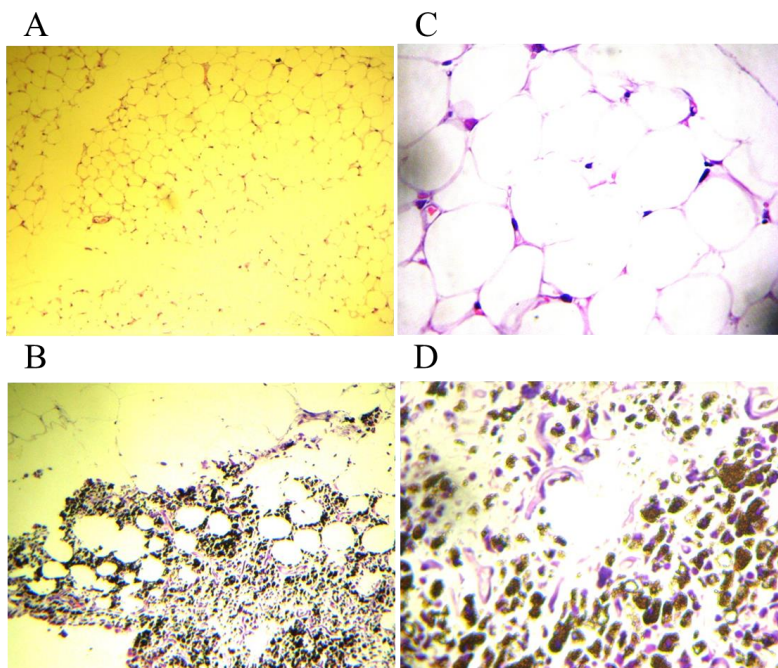
Figura 7. Efeitos do tratamento com TiO₂-NPs sobre o peso, índice de Lee e acúmulo de gordura.



A variação de peso corporal (A), índice de Lee (B), acúmulo de gordura visceral (C) e acúmulo de gordura epididimal e subcutânea (D) foram comparados com seus respectivos controle nos animais não tratados (Co). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n = 6), * p < 0,05 e *** p < 0,001.

Analisando histologicamente a gordura abdominal dos animais tratados pôde-se observar um grande infiltrado inflamatório de células mononucleares, citoplasma estendido, além da presença de pigmento marrom no interior dos adipócitos (Figura 8). A presença de pigmento marrom no interior dos adipócitos pode ser devido a (i) presença do titânio no interior dos adipócitos, que após processamento do tecido para avaliação histopatológica passou a apresentar coloração marrom, ou (ii) devido a presença de tecido adiposo marrom onde deveria haver apenas tecido adiposo branco. Mais estudos são necessários para esclarecimento de ambas às hipóteses.

Figura 8. Análise histológica do tecido adiposo do abdômen dos animais após tratamento com TiO₂-NPs.



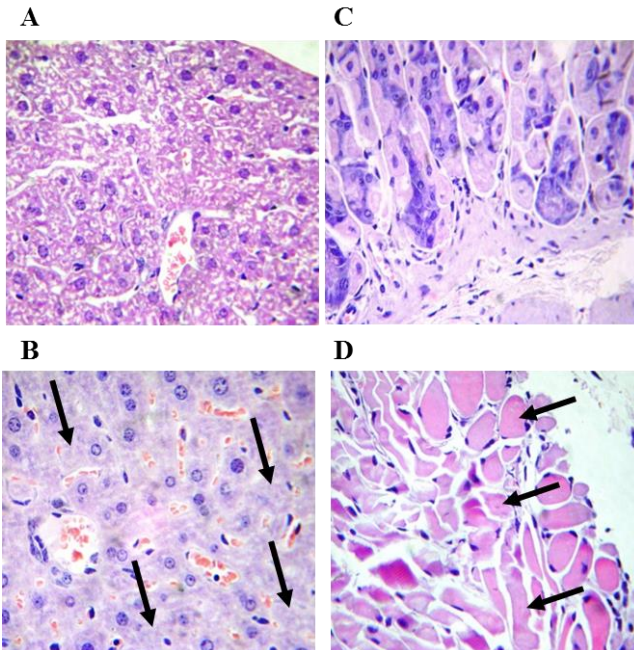
Imagens A (100 x) e C (400 x) são representativas da aparência microscópica da gordura abdominal dos animais controle, e imagens B (100 x) e D (400 x) mostram infiltrado inflamatório mononuclear, citoplasma estendido e presença de pigmento marrom.

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, metabolicamente ativo, capaz de ativar diferentes vias inflamatórias e ainda estresse oxidativo. Neste estudo, a deposição de gordura na área visceral e a presença de infiltrado mononuclear no tecido adiposo após tratamento com TiO₂-NPs sugerem que esta formulação pode favorecer o aparecimento de infiltrado mononuclear local. Além disso, a reação inflamatória observada pode ser resultado dos componentes da formulação, como sugerido em trabalho anterior com nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Neste trabalho, a administração diária de NLS em camundongos resultou em significativa inflamação local. Na ocasião sugerimos que este resultado era devido à matriz lipídica das

nanopartículas que favoreceram a infiltração mononuclear, bem como, a deposição de gordura no tecido adiposo visceral e subcutâneo (SILVA *et al.*, 2013b).

O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias pode resultar não apenas em recrutamento mononuclear no tecido, mas também em lesão hepática e fibrose (BYRNE, 2010). Este parece ser o mecanismo envolvido com os efeitos tóxicos de TiO₂-NPs ao fígado, uma vez que avaliando histologicamente os órgãos dos animais tratados com estas partículas, foi possível observar degeneração vacuolar fina dos hepatócitos em 85% dos animais (Figura 9-B). Além disso, pôde-se observar também degeneração hialina do músculo liso do estômago de 50% dos animais, como mostrado na Figura 9-D. As Figura 9-A e C correspondem aos cortes histológicos do fígado e estômago, respectivamente, dos animais controle. Os demais órgãos analisados (rins, pulmão, coração, cérebro e baço) não apresentaram alterações histológicas (dados não mostrados).

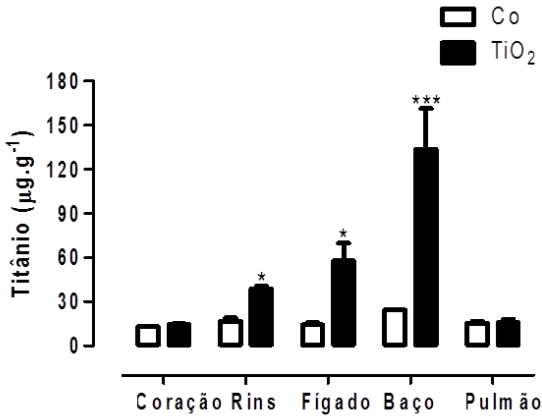
Figura 9. Análise histológica do fígado e estômago após tratamento com TiO₂-NPs.



Imagens (A/C) correspondem respectivamente ao fígado e estômago dos animais controle, sem alterações, imagem (B) mostra degeneração vacuolar dos hepatócitos e (D) degeneração hialina do músculo liso do estômago (magnificação de 400 x).

Os resultados encontrados na avaliação histopatológica do fígado dos animais tratados com TiO₂-NPs corroboram com os parâmetros bioquímicos obtidos em estudo anterior com essas partículas, mostrado na introdução deste capítulo (Tabela 1), em que houve um ligeiro aumento nos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) após o tratamento com TiO₂-NPs, de 101 ± 10 UI/l nos animais controle para $140 \pm 7,19$ UI/l nos animais tratados com TiO₂-NPs ($p < 0,05$). Segundo Peters e colaboradores (2005), o aumento significativo de AST pode ser indicativo de dano às células do fígado, mas não significa necessariamente perda da capacidade funcional, que pode ser confirmado por alterações nos níveis séricos de albumina e proteínas totais (PETERS, 2005). Uma segunda hipótese para o aumento significativo da enzima AST seria um dano ao músculo esquelético. De acordo com Janssen e colaboradores (2005), o músculo esquelético contém isoenzimas como creatina fosfoquinase (CPK), AST e alanina aminotransferase (ALT), que podem ser liberadas na corrente sanguínea como resposta a um dano muscular, como necrose. Estudos bioquímicos mais detalhados são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no aumento significativo da enzima AST após tratamento com TiO₂-NPs. Alguns estudos mostram que a dificuldade de excreção de TiO₂-NPs em camundongos pode culminar no acúmulo de titânio em diferentes órgãos como o fígado, que é considerado o principal órgão de desintoxicação (OBERDÖRSTER *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2007). Ainda, uma vez opsonizadas as nanopartículas acumulam-se nos macrófagos pela incapacidade das enzimas lisossômicas em metabolizar material inorgânico (IVANOV *et al.*, 2012). Como parte do SER, os macrófagos encontram-se naturalmente no fígado, baço e pulmão, favorecendo o acúmulo de nanopartículas nesses órgãos. De acordo com Figura 10, houve acúmulo significativo de titânio nos rins, fígado e baço dos animais tratados com TiO₂-NPs.

Figura 10. Determinação da presença de titânio nos órgãos dos animais tratados com TiO₂-NPs.



Os animais foram tratados pela via intraperitoneal com 2 mg/kg/dia de TiO₂-NPs ou solução salina (animais controle - Co), durante 10 dias. No último dia de tratamento, os animais foram mortos e os órgãos retirados para análise por ICP-MS. * p <0,05 e *** p <0,001.

Os resultados aqui encontrados estão de acordo com trabalhos publicados por outros pesquisadores como Wang e colaboradores (2007) e Fabian e colaboradores (2008). No primeiro trabalho, a exposição oral única de uma dose elevada (5 g/kg) de TiO₂-NPs (25 nm) em camundongos levou a um aumento nos níveis séricos das enzimas ALT e lactato desidrogenase (LDH) (WANG *et al.*, 2007). No trabalho publicado por Fabian e seus colaboradores (2008), a administração endovenosa de 5 mg/kg de TiO₂-NPs com aproximadamente 100 nm levou ao acúmulo de titânio no fígado, baço, pulmão e rins (FABIAN *et al.*, 2008). Porém, vale ressaltar que a dose de TiO₂-NPs avaliada aqui foi menor do que as doses utilizadas nos trabalhos citados, e mesmo assim foram encontradas alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos relacionados com toxicidade.

4. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados e discutidos nesse capítulo, podemos concluir que TiO₂-NPs aqui avaliadas induziram toxicidade em camundongos após administração intraperitoneal por 10 dias. Além da diminuição do ganho de peso, após tratamento os animais apresentaram aumento significativo no acúmulo de gordura abdominal além de infiltrado mononuclear no tecido adiposo. Por meio da avaliação histopatológica observou-se ainda degeneração vacuolar fina dos hepatócitos em 85% dos animais tratados além de degeneração hialina do músculo liso do estômago em 50% dos animais. Por fim, a análise da presença de titânio nos órgãos identificou maior acúmulo das partículas no baço, fígado e rins dos camundongos.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS
SUPERPARAMAGNÉTICAS DE
ÓXIDO DE FERRO (SPIONS)

1. Introdução

Uma variedade de sistemas nanoestruturados têm sido propostos na terapia e diagnóstico do câncer, incluindo nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONS). Estas partículas consistem em um núcleo feito de óxido de ferro, constituído de magnetita ou maguemita, podendo ser deslocado e direcionado por meio de um campo magnético externo. Assim, as SPIONS possuem a capacidade de transportar fármacos para locais específicos, proporcionando a chegada e a liberação do fármaco no local desejado. Adicionalmente, esta manipulação pode evitar possíveis reações adversas causadas pela ligação inespecífica das nanopartículas em tecidos saudáveis (WEISSLEDER *et al.*, 1995; MCCARTHY e WEISSLEDER, 2008).

Outra aplicação terapêutica promissora das SPIONS é a hipertermia fluído-magnética, a qual é baseada na geração de calor para induzir a morte celular localizada (no tumor). Ou seja, uma vez que as partículas chegam ao órgão ou tumor alvo, e devido à capacidade intrínseca de gerar calor após exposição a um campo magnético variável, estas destruiriam as células cancerígenas por meio de hipertermia (HILGER *et al.*, 2005). Além disso, as SPIONS podem ser usadas como agentes de contraste, o que permite localizá-las com a aplicação do campo magnético.

Uma estratégia para aumentar a permanência das SPIONS na corrente sanguínea, impedindo o reconhecimento pelas células de defesa do corpo humano, é a conjugação com polímeros como o polietileno glicol (PEG), processo chamado de peguilação (VERONESE e PASUT, 2005; PARK *et al.*, 2014). O PEG, quando ligado as SPIONS, impede a interação partícula-proteínas plasmáticas e posterior opsonização, aumenta a estabilidade entre as partículas via repulsão estérica (PARK *et al.*, 2012), além de propiciar a ligação de outras substâncias (LACONTE *et al.*, 2007).

O peso molecular e estrutura da cadeia de PEG são determinantes na interação com sistemas biológicos. Apesar de aumentar o raio hidrodinâmico das partículas, a ligação com PEG de cadeias e densidades maiores resulta no aumento do tempo de meia vida das partículas *in vivo* (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; DAOU *et al.*, 2009), o que é indispensável para algumas aplicações como na entrega de fármacos ou contraste na captura de imagem (JOKERST *et al.*, 2011). Além disso, é considerado biocompatível, apresentando pouca ou

nenhuma toxicidade quando administrado por diferentes vias de administração (VERONESE, 2009).

Tendo em vista as inúmeras e promissoras aplicações das SPIONS, especialmente no tratamento do câncer por meio da hipertermia fluido-magnética, avaliamos inicialmente a toxicidade e a captação celular *in vitro* de SPIONS conjugados com duas cadeias de PEG e nomeados SPION-PEG350 e SPION-PEG2000. A avaliação dos efeitos *in vivo* foi realizada apenas com a SPION-PEG2000.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

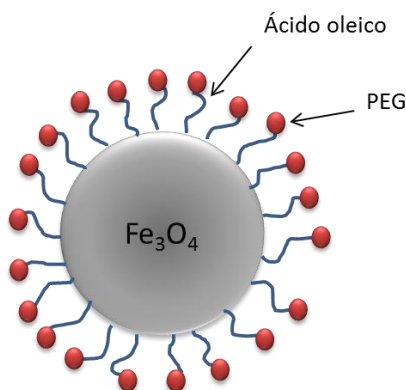
Kits usados para avaliação *in vivo* dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram adquiridos da Labtest Diagnóstica SA, (Lagoa Santa, MG, Brazil); ácido etilenodiaminotetra acético (EDTA) foi adquirido da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) da Ludwig Biotech, dimetilsulfóxido (DMSO) da Merck (Darmstadt, Germany); o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), o Azul de Tripan, hidróxido de sódio (NaOH), Ficoll-paque, paraformaldeído, faloidina, 4'-6- diamidino-2-phenylindole (DAPI); fibrinogênio, albumina e transferrina ligadas a substâncias fluorescentes foram adquiridas da Life Technologies (Paisley, UK); kits ELISA foram adquiridos da BD OptEIA (San Jose, US); meio de cultura dulbeco (DMEM) e soro fetal bovino inativado foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brazil), penicilina e estreptomicina da Gibco (Grand Island, NY, USA).

2.2 Síntese e caracterização das SPIONS

A síntese das SPIONS foi realizada pelo Dr. Ênio Lima, no centro Atômico de Bariloche, em Bariloche, na Argentina. De forma sucinta, as nanopartículas foram preparadas a partir do aquecimento sob agitação de trisacetilacetato de ferro III, ácido oleico e tri-n-octilamina. Após a síntese, as nanopartículas foram precipitadas pela adição de etanol (97%) seguido de centrifugação. Para conjugação com polietileno glicol (PEG), mPEG350 e mPEG2000 foram adicionados às nanopartículas previamente dispersas em clorofórmio. Após a evaporação do clorofórmio as nanopartículas nomeadas SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 foram dispersas em água (10 mg/ml). Para os

ensaios utilizando SPIONS ligados a uma substância fluorescente, isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adicionado às formulações sob aquecimento. Para final separação das partículas ligadas ao FITC utilizou-se um campo magnético externo. A Figura 11 trata da representação esquemática das SPIONS aqui sintetizadas e avaliadas.

Figura 11. Representação esquemática das SPIONS.

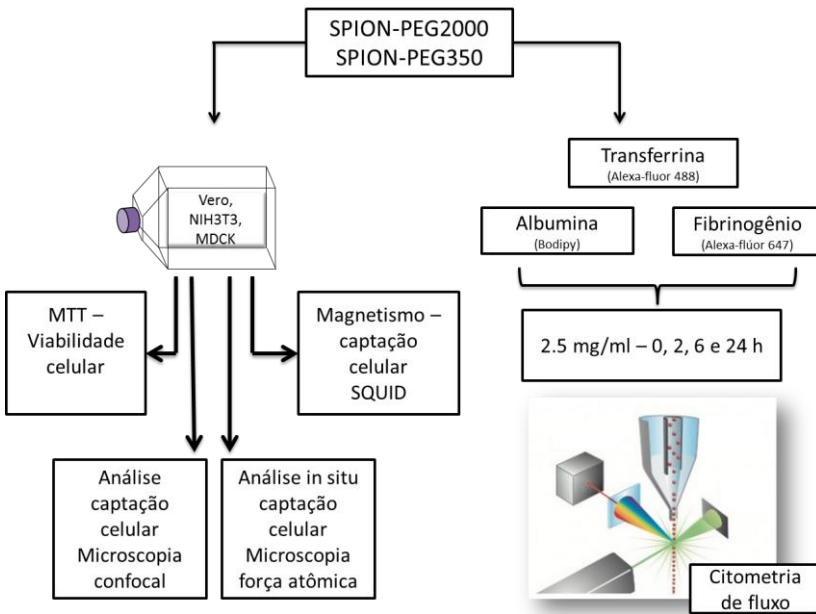


A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi realizada pelo grupo do Dr. Ênio Lima, em Bariloche, usando um microscópio Philips CM200 operado a 200kV. O tamanho das partículas também foi avaliado por dispersão em Zetasizer 1000 (Malvern Instruments).

2.3 Estudos *in vitro*

A Figura 12 mostra o delineamento experimental para avaliação *in vitro* de SPION-PEG2000 e SPION-PEG350.

Figura 12. Delineamento experimental para avaliação *in vitro* de SPION-PEG2000 e SPION-PEG350.



2.1.1 Cultura Celular

As linhagens celulares de epitélio de rim de macaco (Vero), fibroblasto de rim de cachorro (MDCK) e fibroblasto de embrião de camundongo (NIH-3T3) foram adquiridas do American Type Cell Culture (ATCC) e mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 mM HEPES

2.1.2 Ensaio de viabilidade MTT com SPIONS

O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para determinar a viabilidade celular por meio da atividade das desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). As células ($1 \times 10^4/0,2$ ml) foram incubadas por 24 horas, em triplicata, com

concentrações crescentes de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 em placas de 96 poços. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado uma nova alíquota de meio contendo MTT (0,25 µg/ml), seguido de incubação por 2 h, a 37 °C. O meio de cultura foi retirado, 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 pelo meio de regra de três simples.

2.1.3 Avaliação da captação das SPIONS pelas células pela medida do magnetismo

Células Vero, MDCK e NIH-3T3 ($1 \times 10^6/3$ ml) foram incubadas com 100 µg/ml de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 por 30 minutos, 24 e 48 h. Após decorrido o tempo de tratamento, o excesso de SPIONS foi removido lavando as células 3 vezes com solução salina (PBS). As células foram removidas da placa, ressuspensas em 500 µl de PBS e a captação das SPIONS pelas células foi determinada pela medida do magnetismo (ZYSLER *et al.*, 2013) em equipamento Squid (Quantum Designs).

2.1.4 Avaliação da captação das SPIONS pelas células por microscopia confocal

A captação de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 ligadas ao FITC foi também avaliada por meio da microscopia confocal (Spectral Leica TCS SP5 II, Wetzlar, Germany) nas células Vero, MDCK e NIH-3T3. Células ($2 \times 10^5/2$ ml) foram incubadas com 100 µg/ml de SPIONS por 24 h em placas de 6 poços contendo lamínulas de vidro. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 3% e mantidas a 4°C por 15 minutos e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS. Filamentos de actina e o núcleo foram corados adicionando faloidina e DAPI de acordo com o protocolo do fabricante. As lamínulas foram então retiradas das placas e montadas em lâminas para visualização em microscópio. As lâminas foram acondicionadas a -20°C, protegidas da luz até a avaliação no microscópio. A captação das SPIONS pelas células foi realizada em aumento de 40X e as barras da escala de tamanho representam 50 µm.

2.1.5 Avaliação da interação das SPIONS com as células por meio da microscopia de força atômica (AFM)

Imagens das células NIH-3T3 vivas foram obtidas usando AFM (Bioscope Catalyst Atomic Force Microscope from Bruker™). As células ($1 \times 10^4/3$ ml) foram incubadas com 100 $\mu\text{g/ml}$ de SPION-PEG2000 por 30 minutos e imediatamente analisadas por AFM. As células foram inicialmente avaliadas em microscópio invertido (Olympus IX81) acoplado ao AFM que foi usado para selecionar a célula a ser visualizada por AFM. O *cantilever* foi posicionado sobre a célula selecionada e imagens foram obtidas no líquido pelo modo contato. Imagens foram adquiridas durante 12 minutos.

2.1.6 Avaliação da interação de SPIONS com proteínas

SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 (2,5 mg/ml) foram incubados com fibrinogênio, albumina e transferrina ligadas respectivamente aos fluoróforos Alexa-fluor 647, bodipy e alexa-fluor 488, na concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Amostras foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com o tamanho e complexidade morfológica das partículas, assim como a fluorescência.

2.2 Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em colaboração com a pesquisadora Claudriana Locatelli da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) - Videira/SC. O tratamento dos animais, a coleta das amostras e análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foram realizados na UNOESC. Todas as nanopartículas objeto de estudo deste capítulo foram avaliadas quanto à toxicidade e efeitos *in vivo*.

2.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos com idade de dois meses, fornecidos pelo biotério da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) - Videira/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

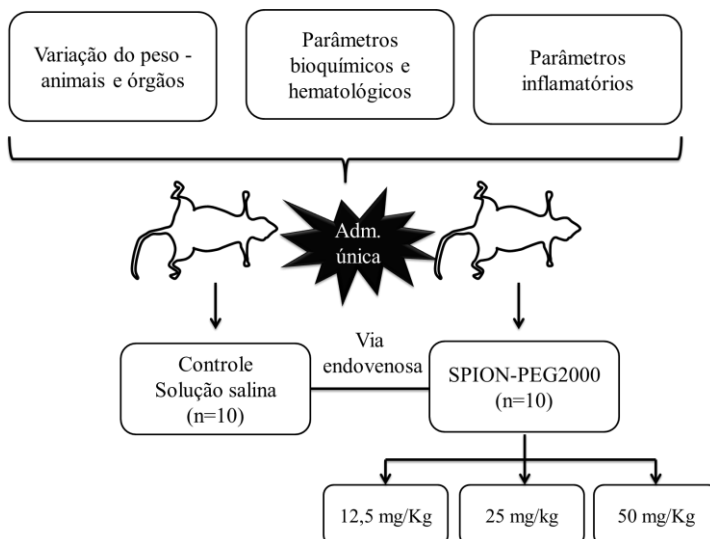
mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida em ambiente com temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNOESC, o qual foi aprovado sob parecer número 01/2012 (Anexo 1).

2.2.2 Tratamentos

Os animais foram tratados com SPION-PEG2000 com base no guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (425/2008), uma diretriz para investigação da toxicidade sistêmica oral de novas substâncias. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o peso, tendo em média de 30 a 40 gramas.

Para avaliação dos efeitos da administração de SPION-PEG2000, os camundongos foram divididos em quatro grupos de dez animais cada. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina e os três grupos de animais tratados receberam as doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg/dia de SPION-PEG2000, como mostrado na Figura 13, pela via endovenosa em dose única.

Figura 13. Delineamento experimental para avaliação da toxicidade e/ou efeitos sub-crônicos após tratamento com SPION-PEG2000.



A formulação de SPION-PEG2000 foi eleita para os experimentos *in vivo*, pois de acordo com resultados prévios obtidos *in vitro*, demonstraram menor efeito citotóxico para todas as linhagens celulares estudadas quando comparados com os resultados obtidos com a SPION-PEG350. Além disso, objetivando a aplicação *in vivo* desta partícula como vetor de fármacos ou mesmo no tratamento do câncer por meio da hipertermia, é importante a permanência na corrente sanguínea por mais tempo, o que de acordo com alguns autores é favorecido pelo maior tamanho da cadeia de PEG (MOSQUEIRA *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2002; VAN VLERKEN *et al.*, 2007; JOKERST *et al.*, 2011).

2.2.3 Parâmetros de toxicidade

Os parâmetros de toxicidade avaliados após a administração de SPION-PEG2000 foram: variação de peso corporal e dos órgãos, parâmetros hematológicos, testes bioquímicos de funções hepática e renal e parâmetros inflamatórios. A avaliação do peso corporal foi realizada individualmente a cada dois dias até o décimo quarto dia quando os animais foram mortos.

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®). Após a eutanásia, os órgãos foram retirados, pesados e preparados para avaliação histopatológica. O sangue coletado foi processado para a realização de hemograma e de 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 porcentagem de hemólise no soro dos animais foi realizada pela técnica de dosagem de hemoglobina livre no soro, usando um kit comercial da marca Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil). A contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo em que foram determinados valores relativos de polimorfos e mononucleares. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando como diluidor o líquido de Dacie e de Turk, respectivamente. Na determinação dos parâmetros bioquímicos tais como as enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, uréia, creatinina e albumina foram utilizados kits comerciais da Labtest®, de acordo com a

metodologia descrita pelo fabricante (técnica semi automatizada em analisador bioquímico Thermo Plate Analyzer®).

A concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) foram determinadas usando um kit ELISA disponível comercialmente (BD OptEIA), de acordo com o manual descrito pelo fabricante. Para tal determinação foi construída uma curva de calibração de acordo com os padrões fornecidos pelo fabricante. Avaliou-se também a captação/acúmulo da SPION-PEG2000 nos órgãos dos camundongos. Para isso, parte dos órgãos (cérebro, pulmão, coração, rins, fígado e baço) foram separados, fixados em crescentes concentrações de etanol e analisados por meio da medida do magnetismo, resultante da presença de SPIONS nos órgãos.

2.3 Análise estatística

Os resultados dos experimentos *in vitro* 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 análises de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Dunnett. Os resultados obtidos com os experimentos *in vivo* foram expressos como a média \pm desvio padrão da média (DPM). Os resultados foram analisados usando GraphPad Prism 5 e análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

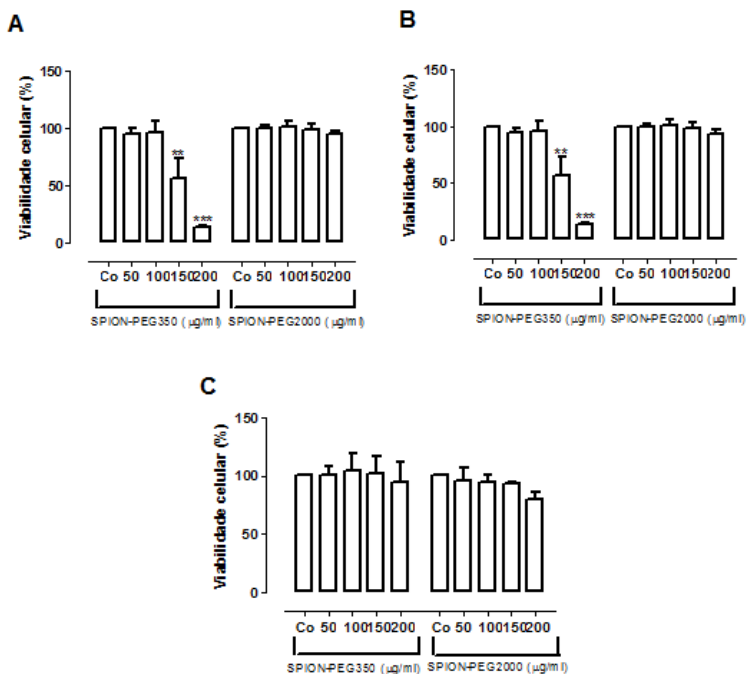
3.1 Estudos *in vitro*

SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 foram sintetizadas e caracterizadas pelo Dr. Ênio Lima, no Centro Atômico de Bariloche, em Bariloche, Argentina. De acordo com a caracterização, as partículas sem o recobrimento de PEG apresentaram tamanho médio de 20 nm e após recobrimento o tamanho médio foi de 80 nm para SPION-PEG350 e 100 nm para SPION-PEG2000. A diferença nos recobrimentos utilizados diz respeito ao peso molecular, sendo que para SPION-PEG2000 o peso molecular de PEG é maior que na formulação de SPION-PEG350.

Neste trabalho foram utilizadas três linhagens celulares para avaliação *in vitro* da citotoxicidade de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000. A importância da utilização de diferentes linhagens celulares é avaliar se as respostas obtidas com os ensaios citotóxicos estão relacionados com as características do material ou com as diferenças morfológicas e estruturais de cada linhagem.

A Figura 14 mostra os resultados do ensaio MTT com as linhagens VERO (A), MDCK (B) e NHI-3T3 (C), expostas a diferentes concentrações de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 durante 24 h. Quanto a toxicidade induzida por SPION-PEG350, observa-se comportamento distinto, dependendo da linhagem estudada: a viabilidade celular das células VERO foi drasticamente reduzida em concentrações superiores a 100 µg/ml, enquanto que para as linhagens MDCK e NIH-3T3 concentrações de até 200 µg/ml não induziram toxicidade. Quanto à formulação de SPION-PEG2000, esta não mostrou ser tóxica para nenhuma das linhagens avaliadas, mesmo na máxima concentração. Embora SPIONS aqui avaliados tenham sido preparados usando o mesmo método e possuam propriedades semelhantes como tamanho e carga, são compostos por cadeias distintas de PEG, o que de acordo com trabalhos já publicados, podem alterar significativamente as respostas de distribuição e toxicidade (MAO *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2011; KHARGHARIA *et al.*, 2013; BARTNECK *et al.*, 2014). Assim, a diferença observada na toxicidade de SPION-PEG350 para células Vero pode estar relacionada com as características da linhagem celular, mas também com o tamanho da cadeia de PEG, uma vez que a mesma concentração de SPION-PEG2000 não foi capaz de induzir o mesmo efeito para linhagem Vero.

Figura 14. Toxicidade de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 em células Vero (A), MDCK (B) e NIH-3T3 (C).

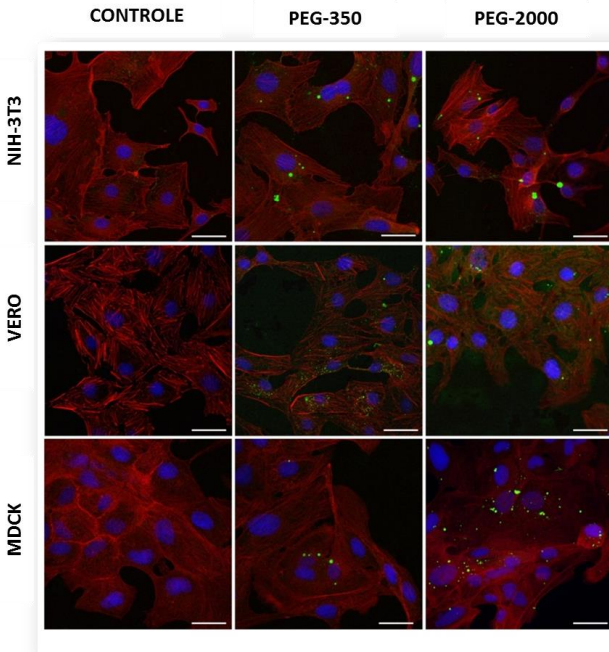


Células foram incubadas com as formulações em concentrações crescentes por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio MTT. A densidade óptica das células não tratadas (Co) foi tomada como 100% de viabilidade celular. Cada barra representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O recobrimento das partículas pode afetar não apenas a viabilidade das células, mas também influenciar na captação, bem como na interação célula-SPIONS (MAHMOUDI *et al.*, 2009). Assim, avaliou-se a captação das formulações de SPIONS pelas células utilizando diferentes técnicas como microscopia confocal e de força atômica, bem como um ensaio baseado nas propriedades magnéticas das partículas. A concentração de SPIONS utilizada para a avaliação da captação foi de 100 $\mu\text{g/ml}$, a máxima concentração não tóxica para as três linhagens celulares utilizadas, baseado no ensaio de viabilidade MTT.

De acordo com os resultados obtidos com a microscopia confocal (Figura 15), a captação de SPION-PEG350-FITC e SPION-PEG2000-FITC ocorreu em todas as linhagens celulares após 24 h de tratamento. É possível visualizar a presença das nanopartículas no interior das células, sempre no citoplasma celular, não sendo identificadas nanopartículas no interior do núcleo. Ambos SPION-PEG2000-FITC e SPION-PEG350-FITC parecem agregar-se em todas as linhagens celulares, com exceção de SPION-PEG350-FITC na linhagem Vero.

Figura 15. Avaliação da captação celular de SPION-PEG350-FITC e SPION-PEG-2000-FITC por microscopia confocal.

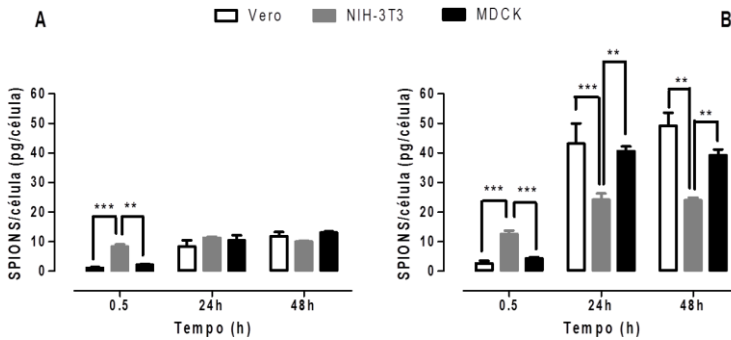


Células NIH-3T3, Vero e MDCK foram incubadas com as partículas por 24 h. Ambos SPIONS estão marcados com FITC e desta forma apresentam-se na imagem em verde. Filamentos de actina foram marcados com faloidina e apresentam-se na cor vermelha e o núcleo corado com DAPI apresenta-se em azul. As imagens foram obtidas com aumento de $40\times$ e as barras de escala representam um tamanho de $50\ \mu\text{m}$.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Shevtsov e colaboradores (2014), onde SPIONS, embora funcionalizados com fator de crescimento epidérmico (EGF), acumularam-se principalmente em estruturas semelhantes aos endossomas e que se localizam próximo ao núcleo (SHEVTSOV *et al.*, 2014). Já a menor agregação de SPION-PEG350-FITC em células Vero poderia explicar o maior efeito citotóxico para esta linhagem, uma vez que o menor tamanho das partículas proporciona um aumento da área de superfície, o que pode aumentar a sua capacidade de interagir com macromoléculas celulares (LUQUE-GARCIA *et al.*, 2013). De acordo com Rabolli e colaboradores, propriedades como tamanho e área de superfície estão frequentemente relacionados com o potencial tóxico de uma formulação de nanopartículas (RABOLLI *et al.*, 2011).

Uma vez que SPIONS são promissores candidatos como carreadores de fármacos ou como contraste na ressonância magnética, um requisito mínimo para estas e outras aplicações biológicas é a capacidade destas estruturas de entrar e permanecer nas células sem serem reconhecidas e degradadas. Embora a microscopia confocal seja uma técnica amplamente utilizada para identificar a captação e localização de nanopartículas pelas células, trata-se de uma técnica majoritariamente qualitativa, o que dificulta a quantificação dessa captação. Assim, utilizou-se uma técnica que possibilita a quantificação da captação de SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 em função do tempo, utilizando a propriedade magnética intrínseca destas partículas. A Figura 16 mostra os resultados obtidos para as três linhagens celulares avaliadas.

Figura 16. Avaliação da captação celular de SPION-PEG350 (A) e SPION-PEG2000 (B) pela medida do magnetismo.



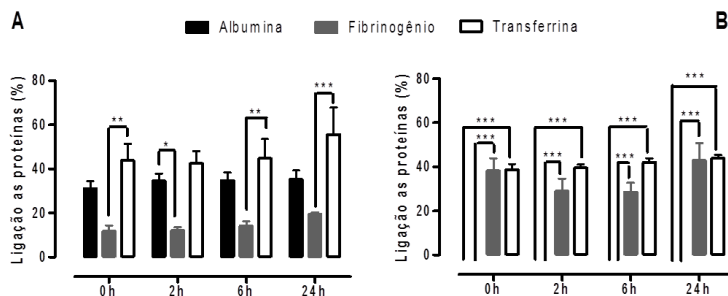
A captação das SPIONS pelas células Vero, NIH-3T3 e MDCK foi determinada a partir das medidas magnéticas em função do tempo de exposição para as três linhagens de células estudadas. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os resultados obtidos com essa técnica foram similares aos obtidos com a microscopia confocal, em que a captação das partículas aconteceu em todas as linhagens. No entanto, a taxa de captação de SPION-PEG2000 foi cinco vezes maior na linhagem Vero, duas vezes maior para NIH-3T3 e três vezes maior para as células MDCK quando comparado com SPION-PEG350, após 24 horas de incubação. De forma geral, a taxa de captação de SPION-PEG2000 variou de 20 a 50 picogramas de SPIONS por célula (pg/célula) enquanto que para SPION-PEG350 a máxima captação não foi maior que 10 a 12 pg/célula, em 48 horas de incubação. Ainda, para SPION-PEG2000 houve diferença significativa entre todas as linhagens celulares, com maior captação nas células Vero. Para o SPION-PEG350 a captação pelas células Vero e MDCK parece ser dependente do tempo, ao contrário da linhagem NIH-3T3, que mostrou captação semelhante nos três tempos avaliados. Assim, de acordo com os resultados obtidos, o tamanho da cadeia de PEG presente em SPION-PEG2000 parece essencial para a captação, aumentando em pelo menos duas vezes essa taxa de acordo com a linhagem celular.

O tamanho da cadeia de PEG pode determinar também a ligação de SPIONS com proteínas presentes no sangue como albumina, fibrinogênio e transferrina. A Figura 17 mostra a interação entre SPION-

PEG350 e SPION-PEG2000 com proteínas ligadas a fluoróforos, nos tempos 0, 2, 6 e 24 h utilizando um método de citometria de fluxo, conforme já descrito anteriormente (LIPTROTT *et al.*, 2014). A interação de SPION-PEG350 ocorreu de forma instantânea, mantendo o mesmo perfil em até 24 h, com interação em torno de 35% com albumina, 15 a 20% com fibrinogênio e aproximadamente 50% com transferrina. Já SPION-PEG2000 parece não interagir com albumina enquanto em torno de 40% das partículas ligaram-se ao fibrinogênio e transferrina. Sabe-se que a interação entre nanopartículas e proteínas plasmáticas depende da presença de grupos funcionais na superfície, carga e tamanho (RAY *et al.*, 2006; PODILA *et al.*, 2012), e que essa interação determina também a aplicação das nanopartículas na terapêutica (LYNCH e DAWSON, 2008; LYNCH *et al.*, 2009). A presença de PEG na superfície das partículas diminui a interação com proteínas plasmáticas e aumenta o tempo de permanência na circulação sanguínea (JULIANO, 1988; LEROUX *et al.*, 1996; YALLAPU *et al.*, 2015). Além disso, de acordo com resultados obtidos por Yallapu e colaboradores (2015), quanto maior o tamanho do PEG, menor é a interação com as proteínas plasmáticas, o que pode explicar os resultados obtidos aqui, em que SPION-PEG2000 não interagiu com albumina, ao contrário de SPION-PEG350, com PEG de menor tamanho, que interagiu com as três proteínas avaliadas (YALLAPU *et al.*, 2015). É importante salientar que, por conta do grande número de proteínas no sangue, estes resultados não descrevem exatamente a interação de SPIONS com proteínas plasmáticas, entretanto confirmam o papel do PEG na interação com as proteínas e por sua vez com os sistemas biológicos.

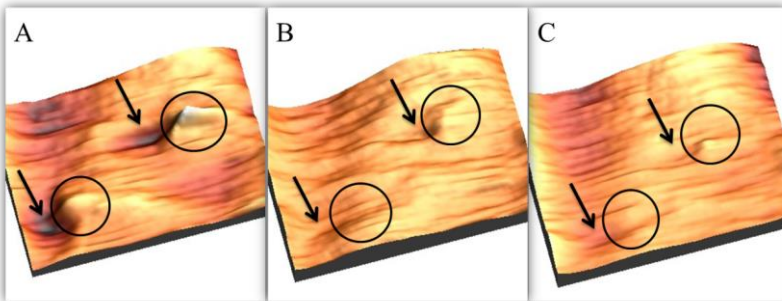
Figura 17. Interação entre SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 e proteínas ligadas a substâncias fluorescentes.



SPIONS (2,5 mg/ml) foram incubadas com fibrinogênio (Alexa-fluor 647), albumina (BODIPY) e transferrina (Alexa-fluor 488) nos tempos 0, 2, 6 e 24 h, na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas. Amostras foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com tamanho e complexidade (FSC/SSC), assim como fluorescência. Os dados são representativos de quatro ensaios independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Além da microscopia confocal e da medida do magnetismo, utilizamos também a microscopia de força atômica para avaliar a interação e captação de SPION-PEG2000 pelas células NIH-3T3. As células foram incubadas com as partículas durante 30 min e a Figura 18 mostra a presença de nanopartículas na superfície de uma célula, como evidenciado pelos círculos, e a formação de picos endocíticos, como indicado pelas setas. As imagens B e C foram obtidas após 8 e 12 min, respectivamente, e mostram o desaparecimento da nanopartícula e dos picos endocíticos, indicando a internalização/captação de SPION-PEG2000 pela célula.

Figura 18. Avaliação da interação/captação de SPION-PEG2000 pela linhagem NIH-3T3 usando microscopia de força atômica (AFM).



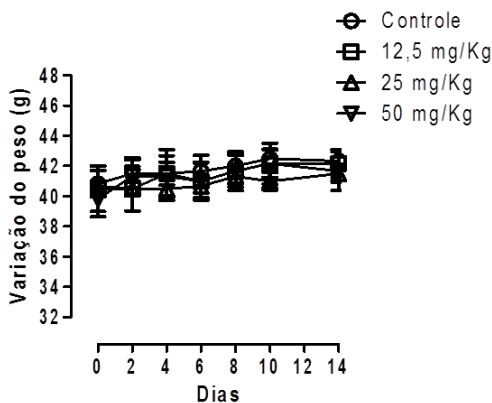
As partículas foram incubadas com as células durante 30 minutos e logo após analisadas usando AFM. Estas imagens foram obtidas em 4 (A), 8 (B) e 12 minutos (C) após o tempo inicial de incubação. As setas indicam os picos endocíticos e os círculos indicam a presença de nanopartículas na superfície da célula.

3.2 Estudos *in vivo*

Apesar da importância dos ensaios *in vitro* na determinação inicial da toxicidade de nanopartículas e outras substâncias, ainda é um grande desafio a extrapolação desses resultados na predição dos efeitos *in vivo*. Antes da utilização de qualquer material nas áreas farmacêutica ou biomédica, especialmente aqueles que se destinam a aplicação endovenosa, é imprescindível a caracterização da biocompatibilidade e potencial toxicidade *in vivo*. Sendo assim, avaliamos a toxicidade/biocompatibilidade de SPION-PEG2000 em camundongos Swiss após a aplicação endovenosa desta formulação. A escolha de SPION-PEG2000 para este estudo se deu por conta dos resultados obtidos *in vitro*, (i) em que nenhuma toxicidade foi observada em todas as linhagens de células, mesmo com a máxima concentração avaliada, (ii) por conta do tamanho da cadeia de PEG, (iii) e pela maior capacidade desta formulação em ser captada por todas as linhagens estudadas.

Todos os animais toleraram as injeções endovenosas de SPION-PEG2000 e nenhum deles morreu durante o tratamento. Não foram observadas alterações comportamentais e no consumo de água e alimento até o 14^o dia em que os animais foram mortos. Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais após o tratamento (Figura 19), assim como no peso dos órgãos (Tabela 4).

Figura 19. Variação do peso dos animais após administração endovenosa de SPION-PEG2000.



O peso dos animais foi avaliado a cada dois dias até o décimo quarto dia, em que foram mortos.

Tabela 4. Peso dos órgãos dos camundongos após administração endovenosa de SPION-PEG2000.

Órgão (g)	Controle	12,5 mg/Kg	25 mg/Kg	50 mg/Kg
Baço	0,2 ± 0,08	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,03
Fígado	2,2 ± 0,1	2 ± 0,1	2 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Cérebro	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,01
Rins	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
Pulmão	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Coração	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02

Fonte: o autor.

Quando sistemas nanoestruturados são administrados pela via endovenosa, o sangue e seus componentes são os primeiros elementos do organismo com quem interagem. Nanopartículas em contato com o sangue podem reagir como um corpo estranho e consequentemente induzir resposta inflamatória além de alterar fatores hematológicos (NEL *et al.*, 2006a). Além disso, o produto resultante da degradação da formulação pode também provocar significativas alterações em parâmetros hematológicos (KARMAKAR *et al.*, 2000). Assim, avaliamos o perfil hematológico dos camundongos após tratamento com SPION-PEG2000 e os resultados estão apresentados na Tabela 5. Estes resultados indicam que quase todos os parâmetros hematológicos avaliados permaneceram similares aos obtidos avaliando-se o grupo controle, com exceção para o número de basófilos, que aumentou significativamente e para o número de células mononucleares, que por sua vez diminuiu significativamente. A alteração no número de basófilos e células mononucleares pode estar associada ao tempo de permanência da formulação na circulação. Resultado semelhante foi observado em um trabalho publicado por Zambaux e colaboradores (2000), em que sistemas nanoestruturados compostos de PLA-PEG e PLGA-PEG permaneceram na circulação sistêmica durante dias enquanto que nanopartículas compostas apenas de PLA e PLGA, sem a presença do PEG, foram removidos do sangue minutos após a administração (ZAMBAUX *et al.*, 2000). O aumento de basófilos é uma resposta biológica comum após a administração endovenosa de algumas substâncias (NIELSEN, 2010).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos dos camundongos após administração endovenosa de diferentes concentrações de SPION-PEG2000.

Parâmetros	Controle	12,5mg/Kg	25mg/Kg	50mg/Kg
Hemácias (/mm ³)	7.900,000 ± 620	7.055,000 ± 435	6.713,000 ± 569	6.879,000 ± 410
Leucócito (/mm ³)	9.191 ± 698	7.293 ± 629	7.216 ± 693	6.875 ± 767
VCM (fl)	63 ± 3	62 ± 2	58 ± 2	60 ± 3
HCM (pg)	21 ± 2	20,5 ± 1,5	19,5 ± 2,5	20 ± 2
CHCM (%)	32,5 ± 1,5	32,5 ± 2,5	32,5 ± 1,5	33 ± 1
Hemoglobina (g/dl)	15 ± 3	15 ± 2	13,5 ± 1	14,5 ± 1,5
Hematócrito (%)	45 ± 4	45 ± 1,3	40 ± 2	44 ± 2
Neutrófilo (%)	24 ± 5	22 ± 6	39 ± 4	40 ± 5
Mononuclear (%)	74 ± 2	65 ± 10	46 ± 5**	42 ± 4**
Bastonete (%)	-----	-----	4 ± 2	2 ± 1
Eosinófilo (%)	-----	-----	-----	-----
Basófilo (%)	2 ± 1	13 ± 2*	11 ± 3	16 ± 5**

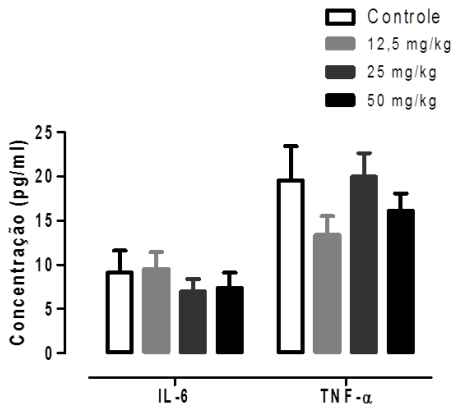
* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

VCM= volume corpuscular médio, HCM=hemoglobina corpuscular média, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média.

Fonte: o autor.

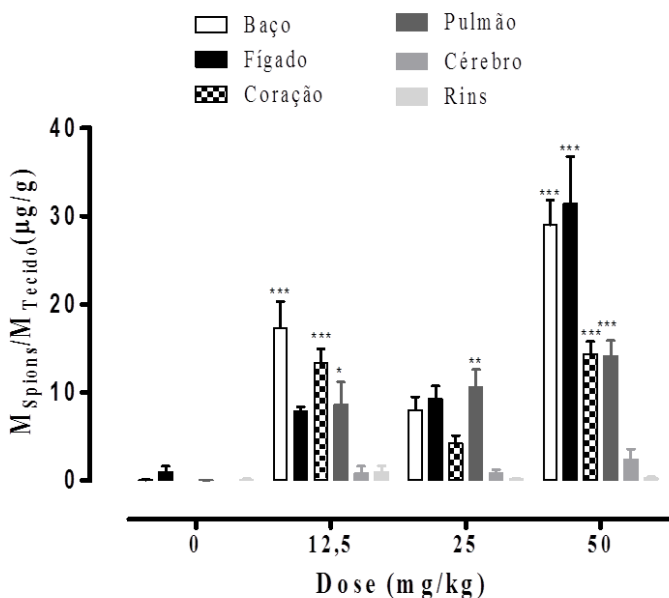
Como já mencionado, uma vez que as nanopartículas chegam a corrente sanguínea, podem provocar uma resposta inflamatória, aumentando ou diminuindo a atividade do sistema imunológico. Com base neste conceito, foram avaliados os níveis séricos de duas citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). Neste sentido, segundo resultados apresentados na Figura 20, não foi encontrado nenhum sinal de inflamação nos camundongos, independente da concentração de SPION-PEG2000 administrada, quando se compara com os resultados dos respectivos controles.

Figura 20. Efeito da administração endovenosa de SPION-PEG2000 nos níveis séricos das citocinas interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).



De acordo com Hauck e colaboradores (2010), após administradas, as nanopartículas podem deixar a corrente sanguínea e atingir órgãos vitais como rins e fígado, induzindo toxicidade após acumularem-se nesses órgãos ou após a liberação de seus constituintes ou metabólitos (HAUCK *et al.*, 2010). Assim, por meio do magnetismo das SPIONS foi possível avaliar o acúmulo nos órgãos dos camundongos após o tratamento. Conforme mostrado na Figura 21, o acúmulo de SPION-PEG2000 ocorreu de forma majoritária e significativa no baço, coração e pulmão dos animais tratados com a dose de 12,5 mg/kg, no pulmão dos animais tratados com 25 mg/kg e no baço, fígado, coração e pulmão dos animais tratados com 50 mg/kg.

Figura 21. Acúmulo de SPION-PEG2000 nos órgãos dos animais após tratamento endovenoso.



Os animais foram tratados com 12,5, 25 e 50 mg/kg, em dose única. O acúmulo nos órgãos foi determinado de acordo com o magnetismo de SPION-PEG2000. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são consideradas marcadores da função hepática e lesão no fígado, bem como a albumina e proteína total (OZER *et al.*, 2008). Ureia e creatinina são comumente usadas como indicadores da função renal, embora não sejam considerados específicos ou sensíveis (HAUCK *et al.*, 2010). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, não houve alteração significativa das enzimas ALT e AST, bem como albumina e ureia dos camundongos tratados com SPION-PEG2000, independente da concentração administrada. Foi observado um ligeiro aumento da proteína total e uma pequena diminuição da creatinina nos animais tratados com a dose de 50 mg/kg. Apesar desse resultado em substâncias descritas como marcadores de

função hepática e renal, apenas uma diminuição das proteínas totais e aumento da creatinina teriam significado do ponto de vista clínico.

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos dos animais controle e tratados com SPION-PEG2000.

Parâmetros	Controle	12,5 2mg/Kg	25mg/Kg	50mg/Kg
ALT (U/l)	153 ± 7,3	170 ± 14	148 ± 11	149 ± 11
AST (U/l)	111 ± 2	114 ± 12	104 ± 13	136 ± 4
Proteínas Totais (g/dl)	5,2 ± 0,06	5,7 ± 0,1	5,9 ± 0,2	6 ± 0,3*
Albumina (g/dl)	2 ± 0,02	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Uréia (mg/dl)	59 ± 4,2	57 ± 5,8	51 ± 1,8	57 ± 4,5
Creatinina (mg/dl)	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,02	0,4 ± 0,01*

* $p \leq 0,05$

ALT=alanina aminotransferase, AST=aspartato aminotransferase

Fonte: o autor.

4. Conclusões

Os resultados indicam que ambas as formulações aqui avaliadas foram consideradas não tóxicas para as linhagens de célula Vero, MDCK e NIH-3T3, até a concentração de 100 µg/ml. Para concentrações maiores, de até 200 µg/ml, SPION-PEG350 mostrou ser tóxico para as células VERO, enquanto SPION-PEG2000 não mostrou toxicidade para todas as linhagens. SPION-PEG2000 apresentou a maior capacidade de internalização/captação celular quando avaliado por microscopia confocal e magnetização, o que possivelmente está relacionado com o maior tamanho da cadeia de PEG. A microscopia de força atômica também foi usada para avaliação da interação de SPION-PEG2000 com células ainda vivas e foi possível identificar a formação de picos endocíticos na superfície celular, seguido da captação/internalização da partícula presente na superfície da célula NIH-3T3. Os estudos *in vivo* mostraram que mesmo com doses de até 50 mg/kg, e embora acumulando-se em alguns órgãos, SPION-PEG2000 não parece ser tóxico, avaliando-se parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios.

Em resumo, as nanopartículas aqui avaliadas, particularmente SPION-PEG2000 que também foi avaliada *in vivo*, constituem promissoras formulações para aplicações como o carreamento de fármacos ou tratamento do câncer por hipertermia, especialmente pela

capacidade de internalização celular e também pela segurança na utilização *in vivo*, nas concentrações e condições avaliadas.

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE
POLIURETANO (PU-NPs)

1. Introdução

Nanopartículas poliméricas vem sendo extensivamente estudadas e têm sido sintetizadas usando diferentes métodos de acordo com a possível aplicação e o tipo de fármaco a ser encapsulado (KUMARI *et al.*, 2010). Sua utilização e aplicação não se restringem apenas a área biomédica, mas também a eletrônica, fotônica, na fabricação de sensores, no controle de poluição ambiental, entre outras (BRAHIM *et al.*, 2001; ZHANG e CHUANG, 2001; JANG e OH, 2002; FUDOUZI e XIA, 2003; RAO e GECKELER, 2011). A utilização na área biomédica se dá especialmente no carreamento de substâncias com potencial ação terapêutica, por possuírem excelente taxa de endocitose, alta eficiência de encapsulação e a capacidade de carrear agentes terapêuticos com diferentes propriedades físico-químicas (FARAJI e WIPF, 2009).

Nanopartículas podem ser preparadas com polímeros biodegradáveis, o que aumenta a aplicação como carreadores de fármacos (WANG *et al.*, 2012). Nas últimas décadas, polímeros têm sido usados como biomateriais devido a propriedades favoráveis como biocompatibilidade, fácil *design* e preparo. De acordo com o trabalho publicado por Plapied e colaboradores, nanopartículas poliméricas são estáveis no sangue, biocompatíveis, não tumorigênicas e capazes de escapar do reconhecimento do SRE (PLAPIED *et al.*, 2011).

O poliuretano é um tipo de polímero que vem sendo usado em aplicações biomédicas nos últimos 30 anos (SUN, X. *et al.*, 2011), devido a versatilidade sintética, excelente propriedade mecânica (BONZANI *et al.*, 2007) e relativa biocompatibilidade (LASCHKE *et al.*, 2009; SUN, X. *et al.*, 2011). No entanto, apesar da grande e promissora utilização de nanopartículas em diferentes áreas, sua utilização tem sido associada com a geração de espécies reativas de oxigênio (SILVA *et al.*, 2012), inflamação (HUSSAIN *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2009), dano mitocondrial (HIURA *et al.*, 2000; UPADHYAY *et al.*, 2003), efeitos carcinogênicos e mutagênicos (DONALDSON *et al.*, 2005; BORM *et al.*, 2006; SAVOLAINEN *et al.*, 2010). Ainda, a relação entre as propriedades dos materiais nanoestruturados e o impacto biológico ou ambiental dessa utilização ainda não está totalmente elucidado (YOKEL e MACPHAIL, 2011).

Assim, tendo em vista a possibilidade da aplicação de nanopartículas de poliuretano (PU-NPs) como carreador de fármacos, avaliamos a toxicidade desta formulação *in vivo*, os efeitos *ex vivo*, além da interação com proteínas.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes

Kits usados para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos *in vivo* foram adquiridos da Labtest Diagnóstica SA, (Lagoa Santa, MG, Brazil); Ficoll-paque, solução balanceada de Hank's (HBSS), meio de cultura criado pelo Instituto Park Roswell (RPMI 1640) e meio de dulbeco modificado por Iscove (IMDM) foram adquiridos da Sigma; fibrinogênio, albumina e transferrina ligadas a substâncias fluorescentes foram adquiridos da Life Technologies (Paisley, UK); kits ELISA foram adquiridos da BD OptEIA (San Jose, US); resíduos de sangue humano foram gentilmente cedidos pelo serviço de transfusão de sangue (Liverpool, UK); tromboplastina da HemosilRecombiPlasTin 2G (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) da (Invivogen via Source Biosciences, Nottingham, UK), kits para imunoenaios da Bioplex Pro Human Cytokine 27-plex (Bio-Rad, UK); Micro beads CD14+ para sangue humano, sistema de separação de células (MACS) e fator de estímulo para formação de colônia de macrófagos (M-CFS) foram adquiridos da Miltenyi Biotec Inc., (Auburn, USA).

2.2 Síntese e caracterização das nanopartículas

2.3 Síntese e caracterização de PU-NPs

A síntese de PU-NPs foi realizada pela Dra. Betina G. Zanetti-Ramos, da Nanovetores Tecnologia S.A., Florianópolis, Brasil. A descrição detalhada da síntese pode ser encontrada em trabalho já publicado (ZANETTI-RAMOS *et al.*, 2006). De forma breve, um triol natural, diisocianato e óleo de oliva foram adicionados a uma solução de Tween 80 sob agitação à temperatura ambiente. O poliuretano foi obtido após homogeneização usando um sonicador Ultra-Turrax® T18 (IKA® Alemanha) seguido de agitação mecânica.

O tamanho médio das partículas, 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 do tamanho das 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 ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potenciais foram calculados a partir dos valores da média de mobilidade eletroforética, por meio da equação de Smoluchowski.

A análise morfológica das partículas foi realizada usando microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para isso, as amostras foram depositadas sobre suporte metálico de cobre (200 mesh) com revestimento de carbono e Formvar e as partículas foram visualizadas em aumento de até 100.000 vezes. O microscópio (JEM – 10-11TEM) foi operado em modo de campo brilhante com voltagem de aceleração de 10 kV.

2.4 Estudos *in vitro*

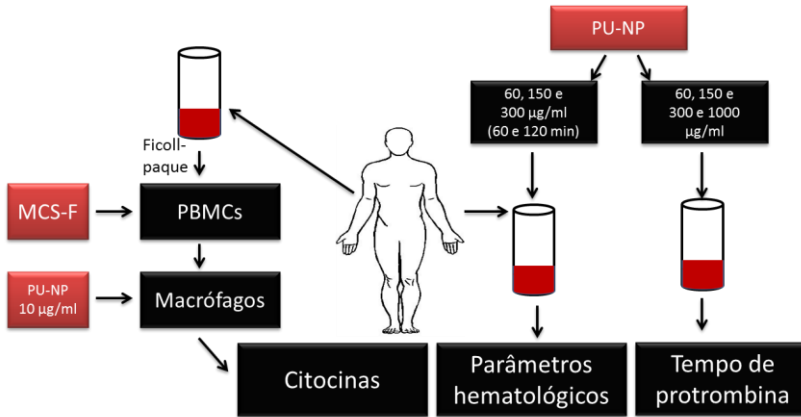
PU-NPs (2,5 mg/ml) foram incubadas com fibrinogênio recombinante, albumina e transferrina ligadas respectivamente aos fluoróforos Alexa-fluor 647, bodipy e alexa-fluor 488, na concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Amostras foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com o tamanho e complexidade morfológica das partículas, assim como a fluorescência.

2.5 Estudos *ex vivo*

Os estudos *ex vivo* foram realizados na Universidade de Liverpool, em Liverpool, Inglaterra, durante doutorado sanduíche realizado nesta universidade. O sangue usado na avaliação dos parâmetros hematológicos e no tempo de protrombina foi coletado de voluntários saudáveis após assinatura do termo de consentimento. Os resíduos de sangue usados para separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram gentilmente doados pelo centro de transfusão de sangue de Liverpool.

A Figura 22 mostra o delineamento experimental para avaliação *ex vivo* de PU-NPs.

Figura 22. Delineamento experimental para avaliação *ex vivo* de PU-NPs.



2.5.1 Cultura de células derivadas de sangue periférico humano

Células mononucleares derivadas de sangue periférico humano foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os macrófagos primários derivados de sangue humano foram mantidos em meio IMDM suplementado com 20% de soro fetal bovino. Todas as linhagens foram mantidas em meio de cultura pH 7,4, em estufa umidificada, a 37°C e 5% CO₂. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi determinado usando contador automatizado (Countess, Invitrogen, UK).

2.5.2 Efeito de PU-NPs na liberação de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos derivados de sangue humano

PBMC's humano foram isoladas de resíduos de sangue doados pelo centro de transfusão de sangue de Liverpool, na Inglaterra. Ao sangue total foram adicionados 35 ml de Ficol-Paque e centrifugados por 30 min (400 × g). PBMC's foram removidos, lavados com tampão HBSS e centrifugados durante 5 min, (400 × g). O *pellet* de células foi ressuspenso em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação, a separação dos monócitos (CD14+) foi realizada utilizando MicroBeads CD14 da Miltenyi Biotec Inc., de acordo com

protocolo disponibilizado pelo fabricante. Para tal separação, PBMC's (1×10^7 células) foram lavados com tampão HBBS, ressuspensos em 80 μ l de tampão de separação (HBBS, 0,5% de albumina, 2 mM EDTA), 20 μ l de MicroBeads para células CD14+ e mantidos de 2 a -8 °C durante 15 min. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão HBBS e centrifugadas durante 10 min ($300 \times g$). O sobrenadante foi completamente aspirado e as células foram ressuspensas em 500 μ l de tampão de separação. Os monócitos (CD14+) foram separados por meio de uma coluna de separação magnética (MACS, Miltenui Biotec Inc.). Para diferenciação de monócitos em macrófagos, células foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 20% de SFB e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CFS) na concentração de 100 ng/ml. As células foram mantidas em condições ideais de crescimento (37 °C, 5% CO₂) por sete dias. Após diferenciação, macrófagos foram usados para determinar o efeito de PU-NPs na liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Macrófagos primários (2×10^6) foram incubados com 10 μ g/ml de PU-NPs ou 10 ng/ml de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) durante 24 h. Após o tempo de incubação, a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) foram avaliados no sobrenadante das células tratadas, de acordo com kit disponível comercialmente (Bioplex Pro Human Cytokine 27-plex, Bio-Rad, UK).

2.5.3 Parâmetros hematológicos após tratamento de sangue periférico humano com PU-NPs

Sangue periférico humano foi coletado de quatro voluntários sadios e armazenado em tubos BD Vacutainer™ (Becton Dickenson, UK) contendo solução de citrato de sódio 0,1 M. Uma alíquota do sangue total (1 ml) foi incubado com 60, 150 e 300 μ g/ml de PU-NPs por 60 e 120 minutos. Após o tempo de incubação o sangue foi analisado de forma automatizada (UniCel® DxH™ 800 Coulter® Cellular Analysis System, Beckman Coulter, UK) de acordo com o número de células sanguíneas em comparação com os resultados obtidos com o sangue sem tratamento.

2.5.4 Efeito de PU-NPs no tempo de protrombina

Para a avaliação do efeito de PU-NPs no tempo de protrombina, o sangue total coletado em tubos BD Vacutainer™ (Becton Dickenson, UK) contendo solução de citrato de sódio 0,1 M foi centrifugado a $400 \times g$ durante 5 min. O plasma foi separado e incubado com 60, 150, 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ de PU-NPs e imediatamente avaliado usando coagulômetro semi automático (4plus MC, ABW Medizin, Alemanha). Este ensaio baseia-se no deslocamento detectável de uma esfera de aço devido ao aumento da viscosidade do plasma em uma cubeta de rotação. O plasma foi incubado com nanopartículas na presença e ausência de tromboplastina.

2.6 Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em colaboração com a pesquisadora Claudriana Locatelli da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) - Videira/SC. O tratamento dos animais, a coleta das amostras e análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foram realizados na UNOESC. Todas as nanopartículas objeto de estudo deste capítulo foram avaliadas quanto à toxicidade e efeitos *in vivo*.

2.6.1 Animais

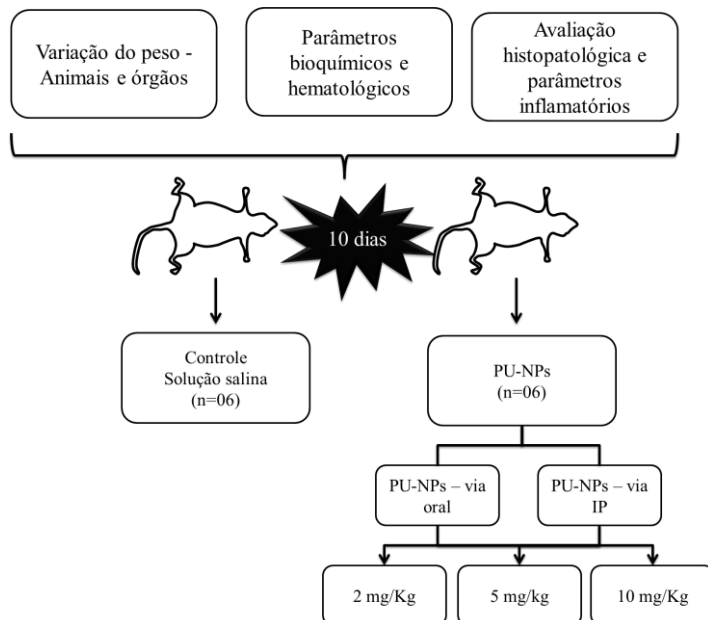
Foram utilizados camundongos albinos com idade de dois meses, fornecidos pelo biotério da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) - Videira/SC. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (15x36x30 cm) forradas com serragem, substituída a cada três dias para manutenção e higiene das gaiolas. 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 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNOESC, o qual foi aprovado sob parecer número 01/2012 (Anexo 1).

2.6.2 Tratamento

Os animais foram tratados com PU-NPs com base no guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (425/2008), uma diretriz para investigação da toxicidade sistêmica oral de novas substâncias. A dose foi determinada em função do volume máximo possível de ser aplicado no animal. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o peso, tendo em média de 30 a 40 gramas.

Para avaliação de PU-NPs, os camundongos foram divididos em oito grupos de seis animais cada, compreendendo dois grupos de animais controle tratados pela via oral e intraperitoneal, que receberam apenas solução salina, e seis grupos de animais que receberam as doses de 2, 5 e 10 mg/kg/dia de PU-NPs, como mostrado na Figura 23, pelas vias oral e intraperitoneal durante 10 dias.

Figura 23. Delineamento experimental para avaliação da toxicidade *in vivo* de PU-NPs.



2.6.3 Parâmetros de toxicidade

Os parâmetros de toxicidade avaliados após a administração de PU-NPs foram: variação de peso corporal e dos órgãos, parâmetros hematológicos, testes bioquímicos de funções hepática e renal e parâmetros inflamatórios. Para examinar mudanças morfológicas, o cérebro, pulmão, coração, rins, fígado, baço, estômago e tecido adiposo foram removidos e pesados. A avaliação do peso corporal foi realizada individualmente a cada dois dias até o último dia de tratamento.

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®). Após serem mortos, os órgãos foram retirados dos camundongos e pesados. O sangue coletado foi processado para a realização de hemograma e de 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 porcentagem de hemólise no soro dos animais foi realizada pela técnica de dosagem de hemoglobina livre no soro, usando um kit comercial da marca Bioclin. A contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo em que foram determinados valores relativos de polimorfos e mononucleares. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando como diluidor o líquido de Dacie e de Turk, respectivamente. Na determinação dos parâmetros bioquímicos tais como as enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), proteínas totais, uréia, creatinina, albumina, colesterol, triglicerídeos e glicose, foram utilizados kits comerciais da Labtest®, de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (técnica semi automatizada em analisador bioquímico Thermo Plate Analyzer®).

Para avaliação histopatológica, amostras do tecido adiposo visceral foram fixados (paraformaldeído 4%), desidratados em álcool, inclusos em bloco de parafina e posteriormente cortados (5µm diâmetro) e corados com hematoxilina e eosina. Cortes dos tecidos foram analisados em microscópio em aumento variando entre 100 e 400 x.

A concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) foram determinadas usando um kit ELISA disponível comercialmente (BD OptEIA), de acordo com o manual descrito pelo fabricante. Para tal determinação foi

construída uma curva de calibração de acordo com os padrões fornecidos pelo fabricante.

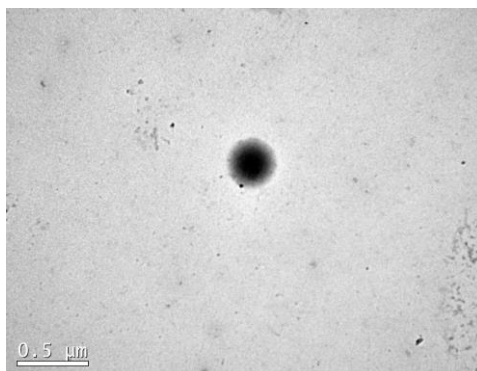
2.7 Análise estatística

Os resultados dos experimentos *in vitro* e *ex vivo* 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 análises de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Dunnett. Os resultados obtidos com os experimentos *in vivo* foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados usando GraphPad Prism 5 e análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

De acordo com a caracterização do tamanho, PDI e potencial zeta, PU-NPs apresentaram diâmetro médio de $249 \pm 5,7$ nm, PDI de $0,3 \pm 0,04$ e potencial zeta de -42 mV (dados não mostrados). Para determinar a morfologia e confirmar o tamanho das partículas, foi realizada análise usando TEM e de acordo com a Figura 24, as partículas apresentaram-se na forma esférica.

Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de PU-NPs.

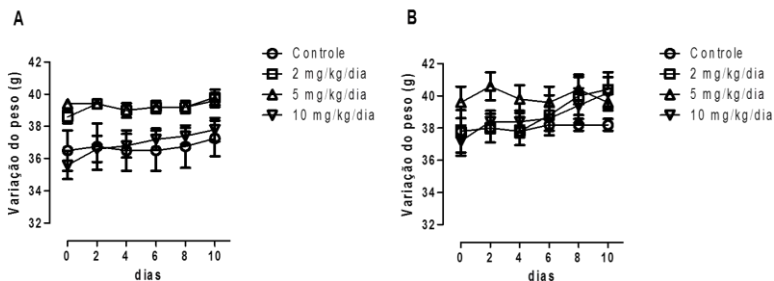


Nanopartículas de poliuretano vem sendo estudadas como promissor sistema carreador de fármacos uma vez que o poliuretano é considerado biocompatível, como já citado por muitos pesquisadores (YOU *et al.*; YUAN *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). Contudo, como já mencionado, é necessário precaução quando se avalia as propriedades de um material apenas na forma bruta, pois podem apresentar comportamento toxicológico completamente diferente quando estruturados na escala nanométrica, uma vez que: (i) o pequeno tamanho aumenta a área de superfície, o que aumenta a reatividade do material (LUQUE-GARCIA *et al.*, 2013); (ii) a carga dos materiais na escala nanométrica pode também influenciar na reatividade, onde superfícies catiônicas tem mostrado maior potencial tóxico quando comparadas com superfícies aniônicas ou neutras (DU *et al.*, 2013); (iii) a forma das nanopartículas pode influenciar na captação, localização e interação com sistemas biológicos, o que pode por sua vez influenciar na toxicidade (ELSAESSER e HOWARD, 2012; DU *et al.*, 2013).

A rota de administração intraperitoneal foi escolhida para este trabalho uma vez que mimetiza a administração endovenosa enquanto possibilita os estudos de toxicidade sub-crônica em camundongos. A administração oral foi também usada devido ao grande número de estudos que utilizam nanopartículas poliméricas para administração oral de fármacos (MCCARRON *et al.*, 2004; HOLPUCH *et al.*, 2010; PLAPIED *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012).

De forma geral ambos os tratamentos, considerando via de administração e dose, foram bem tolerados pelos animais; nenhum animal morreu e não foram observadas alterações comportamentais e no consumo de água e alimento durante e após os 10 dias de tratamento.

Alteração de peso é considerado um valioso indicador da toxicidade *in vivo* (SU *et al.*, 2011). Diferenças no ganho de peso foram avaliadas a cada dois dias e não houve diferença significativa entre os grupos tratados e seus respectivos controles, como mostrado na Figura 25.

Figura 25. Variação de peso dos animais tratados com PU-NPs.

Animais foram tratados com diferentes doses durante 10 dias, pelas vias i.p. (A) e oral (B), e o peso foi avaliado a cada dois dias.

Órgãos como baço, cérebro, estômago, pulmão, fígado, coração e rins foram também pesados após 10 dias de tratamento e não houve diferença significativa no peso quando comparado com os respectivos controles (Tabela 7 e Tabela 8).

Tabela 7. Peso dos órgãos dos camundongos tratados pela via i.p. com PU-NPs.

Órgão (g)	Controle	2 mg/kg/dia	5 mg/kg/dia	10 mg/kg/dia
Baço	0,140 ± 0,01	0,147 ± 0,0	0,185 ± 0,02	0,176 ± 0,01
Cérebro	0,337 ± 0,03	0,380 ± 0,01	0,352 ± 0,01	0,413 ± 0,02
Estômago	0,266 ± 0,01	0,317 ± 0,02	0,298 ± 0,02	0,253 ± 0,01
Pulmão	0,234 ± 0,07	0,236 ± 0,01	0,237 ± 0,01	0,223 ± 0,01
Fígado	1,83 ± 0,07	1,83 ± 0,06	1,80 ± 0,04	1,81 ± 0,06
Coração	0,191 ± 0,02	0,214 ± 0,01	0,175 ± 0,01	0,160 ± 0,01
Rins	0,258 ± 0,01	0,275 ± 0,07	0,330 ± 0,02	0,27 ± 0,01

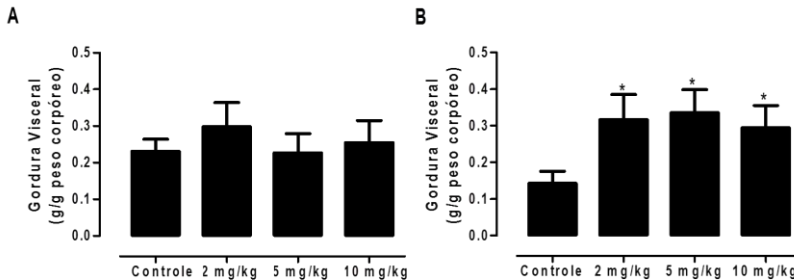
Fonte: o autor.

Tabela 8. Peso dos órgãos dos camundongos tratados pela via oral com PU-NPs.

Órgão (g)	Controle	2 mg/kg/dia	5 mg/kg/dia	10 mg/kg/dia
Baço	0,151 ± 0,01	0,136 ± 0,01	0,133 ± 0,01	0,142 ± 0,01
Cérebro	0,337 ± 0,04	0,340 ± 0,03	0,359 ± 0,02	0,356 ± 0,03
Estômago	0,265 ± 0,01	0,293 ± 0,01	0,252 ± 0,01	0,285 ± 0,01
Pulmão	0,220 ± 0,01	0,220 ± 0,01	0,241 ± 0,02	0,234 ± 0,01
Fígado	1,65 ± 0,07	1,84 ± 0,08	1,65 ± 0,04	1,807 ± 0,08
Coração	0,187 ± 0,01	0,181 ± 0,01	0,191 ± 0,02	0,175 ± 0,01
Rins	0,276 ± 0,01	0,284 ± 0,01	0,298 ± 0,01	0,294 ± 0,01

Fonte: o autor.

Contudo, embora não tenha sido observada diferença na variação de peso, animais tratados pela via oral com PU-NPs apresentaram um aumento macroscópico e significativo no acúmulo de gordura visceral (0,317 g/g, 0,336 g/g e 0,294 g/g, respectivamente, *versus* 0,143 g/g nos animais não tratados, $p < 0,05$), em todas as doses avaliadas, como mostrado na Figura 26.

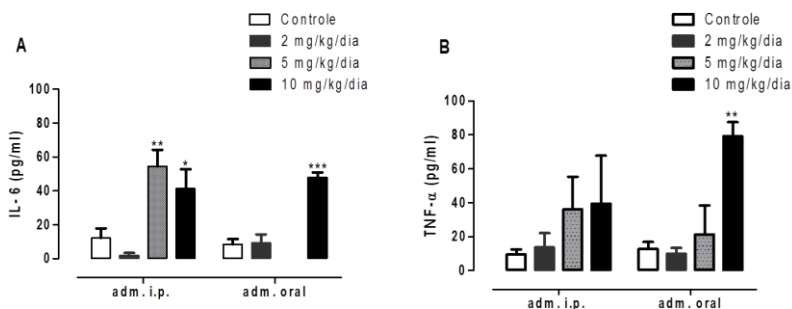
Figura 26. Efeito de PU-NPs no acúmulo de gordura visceral.

Animais foram tratados pelas vias i.p. (A) e oral (B) com 2, 5 e 10 mg/kg/dia de PU-NPs. Os resultados estão expressos como a média ± EPM (n=6). * $p < 0,05$.

De acordo com Indulekha e colaboradores (2011), existe uma estreita relação entre o aumento da gordura visceral e citocinas pró-inflamatórias (INDULEKHA *et al.*, 2011). Para correlacionar os resultados de acúmulo de gordura e inflamação, avaliamos os níveis séricos de duas citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 nos animais tratados com PU-NPs, uma vez que estas citocinas estão envolvidas na regulação da resposta imune, hematopoiese e inflamação (AKIRA *et al.*, 1990). De acordo com os resultados obtidos, houve um aumento nos

níveis séricos de IL-6 nos animais tratados com 5 ou 10 mg/kg/dia de PU-NPs pela via i.p., induzindo aumento em torno de 50 e 40 vezes, respectivamente. De maneira similar, a administração oral de 10 mg/kg/dia de PU-NPs resultou no aumento significativo de IL-6 (~50 vezes) quando comparado com o respectivo controle (Figura 27-A). Com relação aos níveis séricos de TNF- α , foi observado aumento de aproximadamente 80 vezes nos animais tratados pela via oral com 10 mg/kg/dia de PU-NPs (Figura 27-B).

Figura 27. Efeito de PU-NPs nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α .

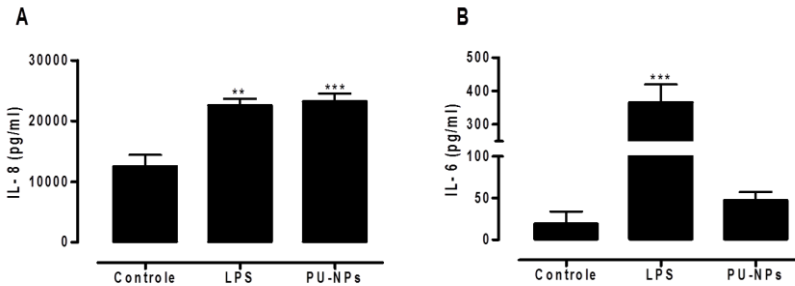


A concentração de IL-6 (A) e TNF- α foi determinada no soro dos animais tratados pelas vias i.p. e oral usando kit ELISA comercialmente disponível.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

Ainda, PU-NPs induziram o aumento de IL-8 quando incubadas com macrófagos derivados de monócitos humanos, o que reforça a hipótese inflamatória. As citocinas IL-8, IL-1 β , IL-6, e TNF- α foram determinadas no sobrenadante de macrófagos derivados de monócitos primários após 24 h de tratamento com PU-NPs ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), usado aqui como controle positivo do método. Não foi observado aumento significativo de IL-1 β e TNF- α , porém a Figura 28 mostra um aumento de aproximadamente duas vezes na liberação de IL-8 por macrófagos tratados com PU-NPs quando comparado com os resultados obtidos com macrófagos sem tratamento. Um aumento em IL-6 também foi observado embora não tenha sido considerado estatisticamente significativo.

Figura 28. Efeito de PU-NPs na liberação de citocinas pro-inflamatórias por macrófagos derivados de monócitos humanos.



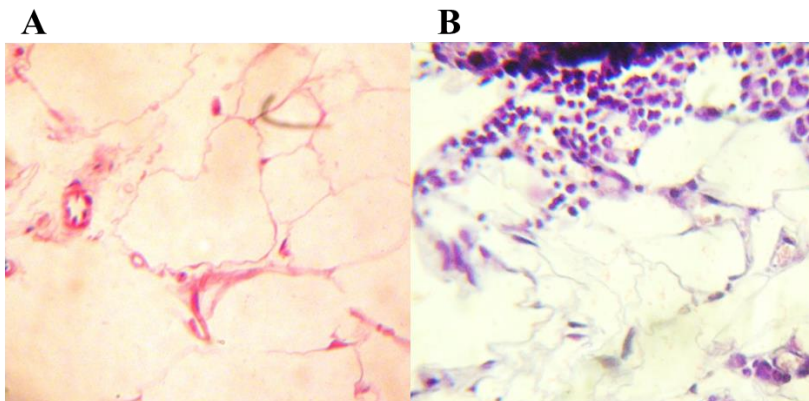
A concentração de IL-8 (A) e IL-6 (B) foram avaliadas no sobrenadante das células após 24 h de tratamento com PU-NPs. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Valores obtidos para IL-1 β e TNF- α não foram mostrados pois estavam abaixo do limite de detecção.

Os resultados deste trabalho mostram coerência com trabalhos *in vivo* de outros autores em que identificaram a capacidade de diferentes sistemas nanoestruturados induzirem inflamação. A administração de nanopartículas de óxido de zinco por instilação em camundongos resultou em aumento da expressão gênica de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-13 no tecido pulmonar dos animais (CHANG *et al.*, 2013). Cho e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos de nanopartículas de ouro ligadas ao PEG após administração endovenosa em camundongos e mostraram efeitos como inflamação aguda e apoptose de hepatócitos (CHO, W.-S. *et al.*, 2009). Além disso, após intensa busca na literatura, não encontramos outros trabalhos que mostrem o acúmulo de gordura em animais tratados com qualquer tipo de formulação de nanopartículas, com exceção do que foi publicado pelo nosso grupo sobre NLS (SILVA *et al.*, 2013b).

A resposta inflamatória desempenha um papel importante na defesa dos sistemas biológicos contra patógenos ou substâncias estranhas ao organismo, removendo restos celulares ou liberando mediadores de reparo tecidual. Contudo, após exposição a certas substâncias tóxicas, a liberação de mediadores pelas células inflamatórias pode causar danos aos tecidos (COPPLE *et al.*, 2003). Este mecanismo pode estar relacionado com os resultados encontrados nos animais tratados com PU-NPs pela via i.p., em que um aumento dos

níveis séricos de IL-6 é seguido de infiltrado inflamatório mononuclear difuso na gordura visceral dos animais, como mostrado na Figura 29.

Figura 29. Análise histopatológica da gordura visceral dos camundongos após tratamento com PU-NPs pela via i.p.



A imagem A é representativa da gordura visceral dos camundongos do grupo controle e a imagem B mostra infiltrado inflamatório mononuclear difuso na gordura visceral dos animais tratados com 10 mg/kg/dia de PU-NPs.

De acordo com Fainboim e colaboradores (2007), a liberação de TNF- α é um dos primeiros eventos em muitos tipos de lesão hepática. De forma semelhante, IL-6 atua como um gatilho modulando a produção de proteínas de fase aguda nos hepatócitos, o que pode culminar em dano ao fígado (FAINBOIM *et al.*, 2007). Este mecanismo pode estar envolvido com os resultados encontrados na avaliação dos parâmetros bioquímicos em que o tratamento com PU-NPs (2, 5 e 10 mg/kg/dia), independente da via de administração, induziu aumento dos níveis séricos de ALT (54 ± 3.7 UI/l, 53 ± 10.3 UI/l, 50 ± 7.5 UI/l, respectivamente, *versus* grupo controle 35 ± 9.1 UI/l, para via i.p. e 58 ± 7.7 UI/l, 69 ± 15 UI/l, 78 ± 4.5 UI/l, respectivamente, *versus* grupo controle 34 ± 3.5 UI/l, para via oral de administração). Além disso, animais tratados com 5 e 10 mg/kg/dia de PU-NPs pela via oral também apresentaram aumento em ALP (20 ± 4 UI/l e 24 ± 2 UI/l, respectivamente, *versus* animais controle, 8.5 ± 1.7 UI/l) (Tabela 9 e Tabela 10).

Tabela 9. Parâmetros bioquímicos dos animais tratados pela via i.p. com diferentes doses de PU-NPs.

Parâmetros	Controle	2mg/kg/dia	5mg/kg/dia	10mg/kg/dia
ALT (UI/l)	35 ± 9,1	54 ± 3,7*	53 ± 10,3*	50 ± 7,5*
ALP (UI/l)	10,5 ± 0,9	7,1 ± 0,7	7,3 ± 1	12 ± 1,1
Albumina (g/dl)	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Proteínas totais (g/dl)	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,02	5,8 ± 0,2	7,2 ± 0,1
Uréia (mg/dl)	39,7 ± 1,8	39,2 ± 1,3	29,2 ± 2	32,4 ± 0,9
Creatinina (mg/dl)	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,01
Triglicerídeos (mg/dl)	136 ± 9,3	93 ± 13,3	81 ± 15	97 ± 8,9
Colesterol(mg/dl)	86 ± 9,3	112 ± 6	104 ± 10	107 ± 3,9
Glicose (mg/dl)	135 ± 1,5	139 ± 4	138 ± 11	110 ± 15

*p ≤ 0.05

ALT=alanina aminotransferase e ALP=fosfatase alcalina.

Fonte: o autor.

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos dos animais tratados pela via oral com diferentes doses de PU-NPs.

Parâmetros	Controle	2mg/kg/dia	5mg/kg/dia	10mg/kg/dia
ALT (UI/l)	34 ± 3,5	58 ± 7,7*	69 ± 15*	78 ± 4,5*
ALP (UI/l)	8,5 ± 1,7	10 ± 3	20 ± 4*	24 ± 2*
Albumin (g/dl)	2,1 ± 0,8	2 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2 ± 0,1
Proteínas totais (g/dl)	6,5 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,1
Uréia (mg/dl)	27 ± 1	28 ± 3	28 ± 1	30 ± 2
Creatinina (mg/dl)	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,03
Triglicerídeos (mg/dl)	78 ± 8	69 ± 7	74 ± 6	81 ± 6
Colesterol (mg/dl)	109 ± 3	118 ± 7	103 ± 3	107 ± 11
Glicose (mg/dl)	102 ± 16	119 ± 10	134 ± 4	142 ± 7

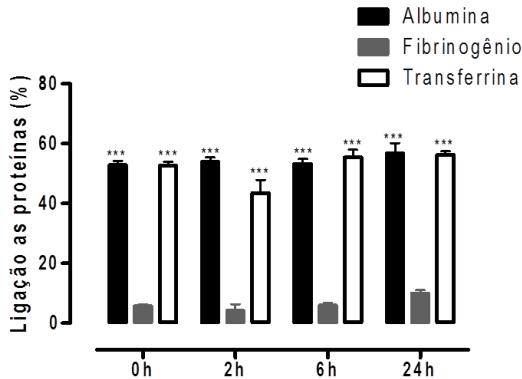
* p ≤ 0.05

ALT=alanina aminotransferase e ALP=fosfatase alcalina.

Fonte: o autor.

As propriedades físico-químicas das nanopartículas influenciam na compatibilidade com componentes do sangue e do sistema de coagulação (ILINSKAYA e DOBROVOLSKAIA, 2013). A adsorção de proteínas presentes no plasma na superfície de nanopartículas acontece instantaneamente quando em contato com o sangue (WANG *et al.*, 2004). Uma vez que as proteínas estão envolvidas na coagulação (ILINSKAYA e DOBROVOLSKAIA, 2013), opsonização (PENG *et al.*, 2014) e ativação do sistema complemento (PACHECO *et al.*, 2013), a formação de uma “coroa de proteínas” na superfície de nanopartículas pode resultar em significativo impacto biológico (FLEISCHER *et al.*, 2013). PU-NPs foram incubadas com proteínas ligadas a substâncias fluorescentes e a interação com albumina e transferrina ocorreu de forma imediata com aproximadamente 50% das nanopartículas (54,2% para albumina e 51,9% para transferrina). Curiosamente, a interação de PU-NPs com fibrinogênio não ultrapassou 10%, mesmo após 24 horas de incubação (Figura 30). De acordo com alguns autores, a biodistribuição de nanopartículas pode ser afetada pela ligação com proteínas específicas (MOGHIMI *et al.*, 2001; DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2008; EHRENBERG *et al.*, 2009). Sugere-se que a ligação com fibrinogênio promove a fagocitose, o que culmina na remoção da partícula da corrente sanguínea (ISHIDA *et al.*, 2001), enquanto que a adsorção da albumina favorece a circulação prolongada no sangue (CAMNER *et al.*, 2002). A citometria de fluxo mostrou ser um método fácil e relativamente barato para avaliar a interação entre nanopartículas e proteínas específicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a ligação às proteínas presentes no sangue, correlacionando com os efeitos *in vivo*.

Figura 30. Interação entre PU-NPs e proteínas ligadas a substâncias fluorescentes.



PU-NPs (2,5 mg/ml) foram incubadas com fibrinogênio (Alexa-fluor 647), albumina (BODIPY) e transferrina (Alexa-fluor 488) nos tempos 0, 2, 6 e 24 h, com 100 µg/ml de proteínas. Amostras foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com tamanho e complexidade (FSC/SSC), assim como fluorescência. Os dados são representativos de quatro ensaios independentes.***p < 0.001.

Dado o fato de que muitas formulações de nanopartículas são preparadas para uso biomédico ou farmacêutico, com potencial aplicação endovenosa, é importante avaliar a hemocompatibilidade (GRUNKEMEIER *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2004; KOZIARA *et al.*, 2005). Assim, os parâmetros hematológicos dos camundongos tratados com PU-NPs foram avaliados e comparados com respectivos controles. Como mostrado na Tabela 11 e Tabela 12 não houve alterações significativas nestes parâmetros após o tratamento.

Tabela 11. Parâmetros hematológicos dos animais controle e tratados com PU-NPs pela via i.p.

Parâmetros	Controle	2mg/kg/dia	5mg/kg/dia	10mg/kg/dia
Hemácias (/mm ³)	5.850.000±750	4.865.000±410	4.013.000±158	5.040.000±251
Leucócito (/mm ³)	4.250 ± 420	3.800 ± 545	5.025 ± 840	4.880 ± 350
VCM (fl)	87 ± 13	106 ± 4,2	110 ± 1,2	109 ± 3,7
HCM (pg)	29 ± 4,5	34 ± 1,6	36 ± 2,8	35,8 ± 2
CHCM (%)	33 ± 4	32 ± 4	33 ± 6	32 ± 4
Hemoglobina (g/dl)	16 ± 0,8	16 ± 0,7	14 ± 0,6	18 ± 0,1
Hematócrito (%)	48 ± 2,7	51 ± 2,4	44 ± 1,5	55 ± 2,8
Neutrófilo (%)	21 ± 3	17 ± 5	15 ± 3	12 ± 5
Mononuclear (%)	76 ± 2	79 ± 5	82 ± 6	64 ± 8
Bastonete (%)	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	-----
Eosinófilo (%)	-----	-----	-----	2±2
Basófilo (%)	-----	1 ± 1	2 ± 1	-----
Hemólise (%)	20 ± 2	15 ± 1	24 ± 3	17 ± 3

VCM= volume corpuscular médio, HCM=hemoglobina corpuscular média, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média .

Fonte: o autor.

Tabela 12. Parâmetros hematológicos dos animais controle e tratados com PU-NPs pela via oral.

Parâmetros	Controle	2mg/kg/dia	5mg/kg/dia	10mg/kg/dia
Hemácias (/mm ³)	4.860.000±292	4.750.00±180	4.805.000±282	5.505.000±152
Leucócito (/mm ³)	7.100 ± 430	6.960 ± 863	7.300 ± 733	5.880 ± 292
VCM (fl)	104 ± 3	102 ± 3	101 ± 5	91 ± 4
HCM (pg)	34 ± 1	35 ± 1	33 ± 2	30 ± 2
CHCM (%)	32 ± 3	33 ± 8	32 ± 4	33 ± 5
Hemoglobina (g/dL)	16 ± 2	16 ± 3	15 ± 2	17 ± 5
Hematócrito (%)	50 ± 2	48 ± 5	48 ± 2	50 ± 4
Neutrófilo (%)	15 ± 1	19 ± 3	16 ± 3	14 ± 2
Mononuclear (%)	88 ± 4	81 ± 3	82 ± 3	88 ± 6
Eosinófilo (%)	---	---	2±1	-----
Basófilo (%)	2 ± 1	3 ± 1	-----	-----
Bastonetes (%)	-----	-----	2 ± 1	2 ± 1

Hemólise (%) 15 ± 2 18 ± 3 15 ± 2 14 ± 2

VCM= volume corpuscular médio, HCM=hemoglobina corpuscular média, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média.

Fonte: o autor.

Embora os parâmetros hematológicos de camundongos tratados com PU-NPs não apresentaram diferenças quando comparados com os parâmetros dos animais controle, avaliamos o efeito desta formulação em sangue humano. Os resultados foram semelhantes àqueles obtidos em camundongos. Parâmetros hematológicos como o número total de células, hemólise e tempo de coagulação permaneceram inalterados como mostrado na Tabela 13 e Tabela 14, além da Figura 31.

Tabela 13. Parâmetros hematológicos após incubação de diferentes concentrações de PU-NPs com sangue humano por 1 hora.

Parâmetros	Controle	60 µg/ml	150 µg/ml	300 µg/ml
Hemoglobina (g/l)	$140 \pm 4,19$	$141,50 \pm 4,05$	$141,25 \pm 3,81$	$139 \pm 4,14$
RBC ($10^{12}/l$)	$4,62 \pm 0,14$	$4,64 \pm 0,16$	$4,62 \pm 0,16$	$4,54 \pm 0,16$
Hematócrito (l/l)	$0,405 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$
VCM (fl)	$87,4 \pm 0,58$	$88,62 \pm 1,87$	$88,75 \pm 1,89$	$89,05 \pm 1,91$
PLT ($10^9/l$)	$266,83 \pm 2,53$	$247,75 \pm 23,63$	$243,50 \pm 23,89$	$240,50 \pm 23,87$
WBC ($10^9/l$)	$6,02 \pm 0,45$	$6,37 \pm 0,73$	$6,40 \pm 0,77$	$6,25 \pm 0,71$
Neutrófilo (%)	$3,38 \pm 0,36$	$3,40 \pm 0,46$	$3,37 \pm 0,44$	$3,32 \pm 0,42$
Linfócito (%)	$2,21 \pm 0,12$	$2,42 \pm 0,27$	$2,42 \pm 0,29$	$2,37 \pm 0,26$
Monócito (%)	$0,35 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,04$
Eosinófilo (%)	$0,03 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,07$
Basófilo (%)	----	$0,02 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,02$	----

RBC=Contagem total de eritrócitos, VCM= volume corpuscular médio, PLT=número de plaquetas, WBC=contagem total de leucócitos.

Fonte: o autor.

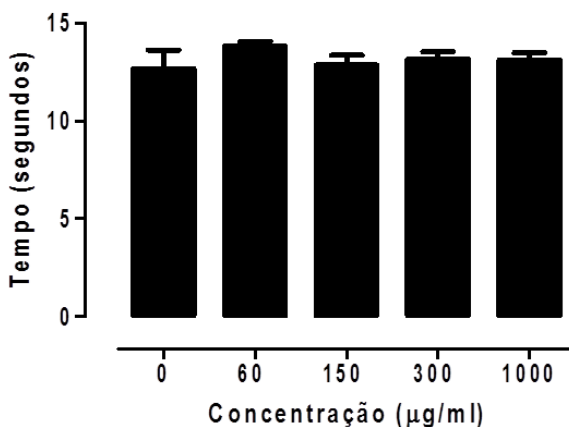
Tabela 14. Parâmetros hematológicos após incubação de diferentes concentrações de PU-NPs com sangue humano por 2 horas.

Parâmetros	Controle	60 µg/ml	150 µg/ml	300 µg/ml
Hemoglobina (g/l)	146 ± 0,84	142,75 ± 3,03	141,50 ± 3,22	139,5 ± 3,20
RBC (10 ¹² /l)	4,74 ± 0,07	4,68 ± 0,14	4,66 ± 0,14	4,58 ± 0,13
Hematócrito (l/l)	0,43 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,40 ± 0,00
VCM (fl)	90,78 ± 1,93	89,30 ± 1,91	89,37 ± 2,22	89,15 ± 2,13
PLT (10 ⁹ /l)	232,33 ± 22,69	250,50±25,93	249 ± 23,82	240,25±21,89
WBC (10 ⁹ /l)	7,03 ± 0,70	6,67 ± 0,83	6,55 ± 0,78	6,45 ± 0,76
Neutrófilo (%)	3,52 ± 0,36	3,52 ± 0,53	3,47 ± 0,47	3,42 ± 0,45
Linfócitos (%)	2,78 ± 0,24	2,52 ± 0,27	2,47 ± 0,26	2,42 ± 0,27
Monócitos (%)	0,50 ± 0,00	0,45 ± 0,05	0,45 ± 0,05	0,45 ± 0,06
Eosinófilos (%)	0,25 ± 0,08	0,1 ± 0,07	0,12 ± 0,09	0,07 ± 0,07
Basófilos (%)	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02

RBC=Contagem total de eritrócitos, VCM= volume corpuscular médio, PLT=número de plaquetas, WBC=contagem total de leucócitos.

Fonte: o autor.

Figura 31. Efeito de PU-NPs no tempo de protrombina.



O soro separado de sangue humano foi incubado com tromboplastina e crescentes concentrações de PU-NPs e imediatamente avaliado com respeito ao tempo de coagulação.

4. Conclusões

De forma conclusiva, o tratamento dos camundongos com PU-NPs induziu inflamação nos animais tratados tanto pela via i.p. quanto pela via oral, o que foi determinado pelo aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, assim como infiltrado mononuclear difuso na gordura visceral. Enzimas hepáticas relacionadas com a função do fígado tiveram seus níveis séricos significativamente aumentados, independente da via ou dose administrada. Os estudos *ex vivo*, usando macrófagos derivados de monócitos primários confirmaram o efeito pró-inflamatório de PU-NPs com aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias no meio de cultura celular após tratamento com as partículas.

CAPÍTULO 4. MODELO
FARMACOCINÉTICO PARA
PREDIÇÃO DO ACÚMULO DE
SPIONS EM CAMUNDONGOS
E HUMANOS

1. Introdução

A utilização de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia, do inglês *physiologically based pharmacokinetic model* (PBPK) vem sendo utilizado nos últimos 30 anos para simulação da farmacocinética de substâncias, especialmente agentes terapêuticos. Esta utilização para simulação da farmacocinética de nanopartículas surgiu apenas em 2006 e segundo a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), trata-se de uma ferramenta promissora na predição do risco da utilização de formulações de nanoestruturas (LI *et al.*, 2010).

A farmacocinética de pequenas moléculas depende de fatores como difusão, transporte ativo, metabolismo enzimático, excreção, enquanto que para nanopartículas estes processos são um pouco mais complexos e não relevantes para pequenas moléculas, uma vez que abrange processos como opsonização, mudanças nas propriedades físico-químicas, reconhecimento celular, entre outros (LI *et al.*, 2010).

Um dos principais desafios no desenvolvimento de um modelo farmacocinético envolvendo nanopartículas é estimar a relação entre as diferentes e possíveis propriedades das nanopartículas com os padrões de distribuição *in vivo*. Abordagens experimentais *in vitro* têm sido desenvolvidas para descrever a interação entre nanopartículas e diferentes populações de células, o que representa uma ferramenta valiosa para estimar a distribuição de nanopartículas e que pode ser integrado ao modelo matemático (MOSS e SICCARDI, 2014).

Tamanho, forma, carga e composição química são algumas das propriedades dos materiais nanoestruturados que podem determinar a captação pelos macrófagos, acúmulo nas células, penetração nos capilares, bem como a ultrafiltração pelos rins (Li & Huang 2008) (Caliceti & Veronese 2003).

Assim, o principal objetivo deste capítulo foi desenvolver um modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK), que seja capaz de prever a farmacocinética de SPION-PEG2000 em camundongos e humanos para uma abrangente avaliação do potencial toxicológico deste tipo de sistema nanoestruturado. Além disso, desenvolvemos uma nova abordagem experimental usando macrófagos derivados de monócitos primários humanos para estimar a cinética de captação de SPION-PEG2000 em camundongos e humanos, sendo este resultado integrado ao modelo farmacocinético. Este capítulo da tese foi desenvolvido na Universidade de Liverpool, em Liverpool, Inglaterra, como parte do doutorado sanduíche realizado no período entre setembro de 2013 e julho de 2014.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro avaliadas neste capítulo foram sintetizadas pelo Dr. Ênio Lima, do Centro Atômico de Bariloche, em Bariloche, Argentina. O método de preparo das nanopartículas aqui avaliadas está descrito no capítulo 2 desta tese. Ácido etilenodiaminotetra acético (EDTA), hidróxido de sódio (NaOH), Ficoll-paque, solução balanceada de Hank's (HBSS), meio de cultura criado pelo Instituto Park Roswell (RPMI 1640), meio de dulbeco modificado por Iscove (IMDM), tripsina, albumina e os reagentes para o ensaio de ferrozine foram adquiridos da Sigma Aldrich (Munich, Germany); resíduos de sangue humano (buffy coats residues) foram gentilmente cedidos pelo serviço de transfusão de sangue (Liverpool, UK); Micro beads CD14+ para sangue humano, sistema de separação de células (MACS) e fator de estímulo para formação de colônia de macrófagos (M-CFS) foram adquiridos da Miltenyi Biotec Inc., (Auburn, USA).

2.2 Estudos *ex vivo*

2.2.1 Avaliação da captação das SPIONS por macrófagos humanos

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano foram isoladas de resíduos de sangue doados pelo centro de transfusão de sangue de Liverpool, na Inglaterra. Ao sangue total foram adicionados 35 ml de Ficoll-Paque e centrifugados por 30 min. ($400 \times g$). PBMCs foram removidos, lavados com tampão HBSS e centrifugados durante 5 min ($400 \times g$). O *pellet* de células foi ressuspenso em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação, a separação dos monócitos (CD14+) foi realizada utilizando MicroBeads CD14 da Miltenyi Biotec Inc., de acordo com protocolo disponibilizado pelo fabricante. Para tal separação, PBMCs (1×10^7 células) foram lavados com tampão HBBS, ressuspenso em 80 μ l de tampão de separação (HBBS, 0,5% de albumina, 2 mM EDTA), 20 μ l de MicroBeads para células CD14+ e mantidos de 2-8 °C durante 15 min. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão HBBS e centrifugadas durante 10 min ($300 \times g$). O sobrenadante foi

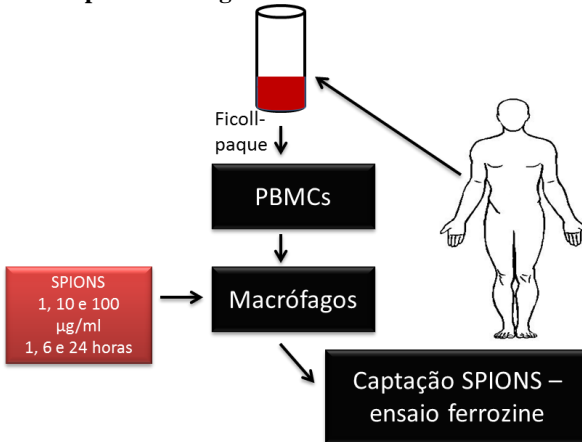
completamente aspirado e as células foram ressuspensas em 500 µl de tampão de separação. Os monócitos (CD14+) foram separados por meio de uma coluna de separação magnética (MACS, Miltenui Biotec Inc.). Para diferenciação de monócitos em macrófagos, células foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 20% de SFB e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CFS) na concentração de 100 ng/ml. As células foram mantidas em condições ideais de crescimento (37 °C, 5% CO₂) por sete dias. Após diferenciação, macrófagos foram usados para determinar a taxa de captação de SPION-PEG2000 em função do tempo e concentração.

Macrófagos primários (2×10^6) foram incubados com concentrações crescentes (1, 10 e 100 µg/ml) de SPION-PEG2000 durante 1, 6 e 24 h. Após o tempo de incubação, a captação de SPIONS foi determinada utilizando ensaio de ferrozine, de acordo com Riemer e colaboradores (2004), com algumas modificações (RIEMER *et al.*, 2004). O ensaio de ferrozine é um ensaio colorimétrico capaz de determinar a quantidade de ferro em amostras biológicas.

As células foram lavadas três vezes com tampão HBBS para remover todas as nanopartículas do sobrenadante e foram soltas utilizando tripsina. O número de células em cada poço foi determinado para definir a captação de SPION-PEG2000 por célula. Após centrifugação durante 5 min a $400 \times g$, as células foram lisadas com 200 µl de NaOH 50 mM durante 2 h sob agitação em atmosfera umidificada. Ao lisado de células (100 µl) foi adicionado 100 µl do reagente de liberação (solução fresca de HCl 1,4 M e 4,5% w/v de KMnO₄ em água) e 100 µl de HCl 10 mM e mantidos overnight a 60 °C, em capela de exaustão. No dia seguinte, uma vez que as amostras atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 30 µl do reagente de detecção de ferro (ferrozine 6,6 mM, neocuproína 6,5 mM, acetato de amônio 2,5 M, ácido ascórbico 1 M) e após 30 min de incubação, 280 µl de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e lidas em leitor de microplacas em 560 nm. O teor de ferro das amostras foi determinado comparando-se os resultados obtidos com a curva de calibração construída de maneira semelhante a que as amostras foram preparadas (100 µl do padrão ferro (FeCl₃ - 0 a 200 µg/ml, 100 µl de NaOH 50 mM, 100 µl do reagente de liberação do ferro e 30 µl do reagente de detecção do ferro). A taxa de captação de SPION-PEG2000 pelos macrófagos foi determinada com base no número de células em cada poço.

A Figura 32 mostra o delineamento experimental para avaliação *ex vivo* da captação de SPION-PEG2000 por macrófagos derivados de monócitos humanos primários.

Figura 32. Delineamento experimental para avaliação da captação de SPION-PEG2000 por macrófagos derivados de monócitos humanos.



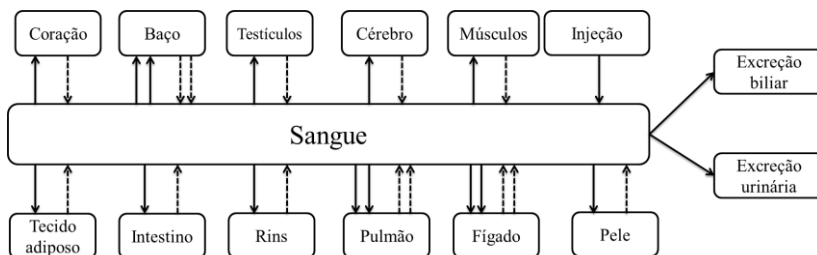
2.3 Estudos *in silico*

2.3.1 Modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK) para predição do acúmulo *in vivo* de SPION-PEG2000

A estrutura do modelo farmacocinético desenvolvido está resumido na Figura 33. O modelo PBPK é uma representação matemática dos processos moleculares, fisiológicos e anatômicos que definem a distribuição de nanopartículas.

A formulação de nanopartículas escolhida para este estudo foi a SPION-PEG2000 por seu acúmulo em camundongos ter sido avaliado, o que permite a validação deste modelo, comparando com os resultados obtidos *in vivo*. As doses usadas nessa simulação foram às mesmas usadas *in vivo*, 12.5, 25 e 50 mg/kg.

Figura 33. Diagrama esquemático do modelo farmacocinético murino e para humanos.



A seta única preta indica a difusão passiva de nanopartículas através das fenestrações capilares; as setas duplas representam a difusão passiva além da captação ativa de nanopartículas pelos macrófagos. As setas tracejadas indicam a liberação de nanopartículas pelos órgãos ou tecidos para a circulação sistêmica. O diagrama mostra também a excreção biliar e urinária das nanopartículas.

Os pesos dos órgãos dos camundongos foram calculados como a porcentagem do peso total do corpo (SAKODA *et al.*, 2010). Os fluxos de sangue para os órgãos em camundongos foram definidos conforme já descrito anteriormente (SAKODA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; BACHLER *et al.*, 2013; DAVIES *et al.*, 2013) e encontram-se resumidos na Tabela 15.

Tabela 15. Fluxo sanguíneo nos órgãos dos camundongos.

Órgão	Fluxo de sangue (ml/min)
Fígado	2,25
Baço	0,16
Coração	0,92
Pulmão	0,07
Cérebro	0,46
Rins	1,27
Pele	0,81
Intestino	1,82
Músculos	2,22
Tecido adiposo	0,98
Testículos	0,11

Fonte: Sadoka *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Bachler *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2013

Fatores anatômicos e demográficos para humanos tais como altura, peso, idade, sexo e índice de massa corpórea foram definidos como já descrito anteriormente (BOSGRA *et al.*, 2012). Estes valores foram utilizados para simular os volumes dos órgãos e tecidos (fígado, pulmão, rim, coração, cérebro, baço, tecido adiposo, intestino, testículos, músculos e pele) por meio de equações matemáticas. Todos os órgãos foram conectados considerando o fluxo de sangue regional e a excreção das SPIONS foi simulada através das rotas biliar e urinária como já descrito por Lankveld e colaboradores (2010) (LANKVELD *et al.*, 2010). As constantes de excreção biliar e urinária estão descritos na Tabela 16 e foram otimizados no modelo de camundongos para melhor se ajustar aos resultados obtidos experimentalmente *in vivo* (BACHLER *et al.*, 2013).

Tabela 16. Constantes de excreção e liberação para camundongos e humanos.

Constante	Símbolo	Valor
Liberação órgão	$k_{\text{órgão_lib_capilar}}$	0,0049
Liberação macrófago	$k_{\text{órgão_lib_macrófago}}$	0,00055
Excreção biliar	$k_{\text{biliar_excreção}}$	0,008
Excreção urinária	$k_{\text{urinária_excreção}}$	0,00023

Fonte: Bachler *et al.*, 2013

As excreções biliar e urinária foram definidas de acordo com as equações:

$$\text{Biliar_excreção} = k_{\text{biliar_excreção}} * B_{\text{NPs}}$$

$$\text{Urinária_excreção} = k_{\text{urinária_excreção}} * B_{\text{NPs}}$$

onde $k_{\text{biliar_excreção}}$ e $k_{\text{urinária_excreção}}$ são as constantes biliar e urinária, respectivamente e B_{NPs} é o número de nanopartículas no sangue.

A distribuição e acúmulo de nanopartículas nos órgãos foram simulados levando-se em conta a difusão passiva das partículas através do endotélio capilar e a captação ativa por macrófagos especializados no

fígado, baço e pulmão (BACHLER *et al.*, 2013). A metodologia empregada para avaliação da taxa de captação de SPION-PEG2000 pelos macrófagos está descrita na seção 2.2.1 deste capítulo. As características do endotélio capilar de cada órgão foram descritas e a influência da fenestra capilar no movimento das nanopartículas foi matematicamente representado no modelo farmacocinético (BACHLER *et al.*, 2013). A descrição do endotélio capilar e as constantes de penetração inclusas no modelo estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17. Tipo e classificação capilar de acordo com a região do corpo.

Tipo de capilar	Símbolo	Tecido	Valor
Não-sinusoidal não-fenestrado com pequenas junções	CT1	cérebro, medula espinhal, tecido linfóide do córtex, músculos, tecido adiposo, pulmão, mesentério intestinal	0,0015
Não-sinusoidal não-fenestrado com junções frouxas			
Não-sinusoidal fenestrado com parede ligeiramente fenestrada	CT2	Testículos, pele, mucosa intestinal, rim	0,012
Não-sinusoidal fenestrado com fenestra aberta			
Sinusoidal reticuloendotelial com fenestra aberta	CT3	Fígado, baço	0,024
Sinusoidal nao-reticuloendotelial			

Fonte: Bachler *et al.*, 2013

A captação através dos capilares é definida pela equação abaixo como previamente descrita (BACHLER *et al.*, 2013):

$$k_{\text{órgãoNPs}} = B_{CT} * (Q_{\text{órgão}} / V_{\text{sangue}})$$

em que: $k_{\text{órgãoNPs}}$ é a constante de penetração através do endotélio capilar, B_{CT} é o fator que descreve a fenestra capilar, $Q_{\text{órgão}}$ representa o fluxo de sangue no órgão e V_{sangue} é o volume total de sangue.

Macrófagos residentes nos tecidos estão presentes no fígado, baço e pulmão e tem como uma de suas funções a retirada de patógenos, restos celulares e partículas da circulação sanguínea, e dessa forma medeiam a captação e distribuição das nanopartículas (MOGHIMI *et al.*, 2001; DAVIES *et al.*, 2013). A taxa de captação de SPION-PEG2000 por macrófagos derivados de monócitos humanos foi determinada em diferentes tempos usando um ensaio colorimétrico como descrito no item 2.2.1. A captação das nanopartículas pelos macrófagos foi descrito de acordo com a equação:

$$k_{\text{órgão_macrófagos}} = (Q_{\text{órgão}} * CL_{\text{int}}) / (Q_{\text{órgão}} + CL_{\text{int}})$$

onde $k_{\text{órgão_macrófagos}}$ é a constante de captação através dos órgãos, $Q_{\text{órgão}}$ é o fluxo de sangue no órgão e CL_{int} representa a captação determinada *in vitro*.

A taxa total de captação pelo fígado, baço e pulmão foram definidos considerando o número de macrófagos em cada órgão seguindo a equação:

$$CL_{\text{órgão}} = CL_{\text{int}} * N_{\text{macrófagos}} * W_{\text{órgão}}$$

onde $CL_{\text{órgão}}$ é a taxa total de captação no órgão, CL_{int} é a taxa de captação avaliado *in vitro* ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{milhões}$ de macrófagos derivados de monócitos), $N_{\text{macrófagos}}$ é o número de macrófagos por grama de tecido ($8,6 \times 10^5$ para o fígado humano (FRIEDMAN *et al.*, 1992) e 1×10^7 para o fígado em camundongos (ten Hagen *et al.* 1996), 2×10^6 para o baço em humanos (Blackley *et al.* 2007) e 45×10^6 para o baço em camundongos (Wang *et al.* 2013) e $1,1 \times 10^6$ para o pulmão em humanos (Brown *et al.* 1997) e 3×10^7 para o pulmão em camundongos (Holt *et al.* 1985) e $W_{\text{órgão}}$ é o peso dos órgãos em gramas.

A taxa de liberação das nanopartículas pelos macrófagos e capilares no modelo para camundongos foi otimizada para melhor se ajustar aos resultados de acúmulo encontrados *in vivo*. Para o modelo humano foram usadas as mesmas constantes validadas para o modelo com camundongos. As equações usadas para estimar a liberação das partículas pelos macrófagos e capilares foram definidas como:

$$\mathbf{Órgão_lib_capilar} = k_{\mathbf{Órgão_lib_cap}} * N_{\mathbf{Órgão.NPs}}$$

$$\mathbf{Órgão_lib_macrófago} = k_{\mathbf{Órgão_lib_macrófago}} * N_{\mathbf{Órgão.NPs}}$$

onde $k_{\mathbf{Órgão_lib_cap}}$ e $k_{\mathbf{Órgão_lib_macrófago}}$ representam as constantes que definem a liberação das nanopartículas através dos capilares e macrófagos, respectivamente, $N_{\mathbf{Órgão.NPs}}$ descreve o número de nanopartículas presentes nos órgãos.

O modelo foi implementado em MATLAB[®] versão 2014a (MathWorks, Natick, MA, USA 2014) usando o aplicativo Simbiology.

2.4 Análise estatística

Os resultados dos experimentos *ex vivo* foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP) de nove poços derivados de três culturas independentes de macrófagos derivados de monócitos humanos. Para a análise estatística dos resultados obtidos, foram utilizados os programas GraphPad Prism 5 e análises de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Dunnett.

3. Resultados e Discussão

Embora vários trabalhos já publicados tenham descrito SPIONS como uma plataforma tecnológica promissora no carreamento de fármacos, contraste para ressonância magnética ou ainda no tratamento do câncer, a compreensão da farmacocinética deste tipo de formulação ainda é limitada, o que representa um grande obstáculo para a efetiva utilização em humanos. Neste cenário, a construção de modelos preditivos da farmacocinética de sistemas nanoestruturados em humanos pode contribuir de forma eficaz uma vez que: (i) desenvolve novas

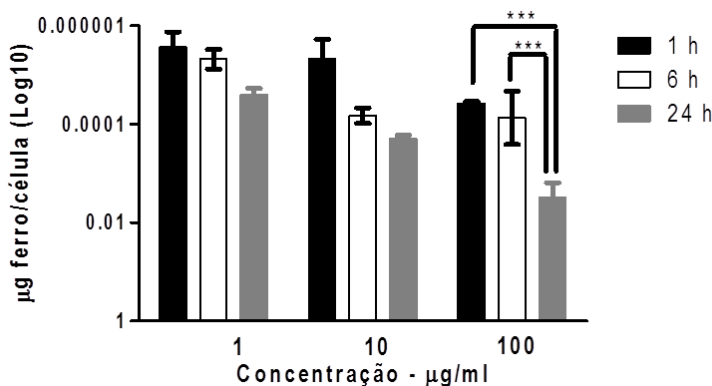
ferramentas que combinam metodologias *in vitro* e *ex vivo*, possibilitando uma melhor compreensão da distribuição de nanopartículas *in vivo*; (ii) cria uma abordagem teórica para avaliação do risco envolvido com a utilização de nanopartículas, reduzindo e otimizando a utilização de animais; (iii) favorece a caracterização da relação entre as propriedades das nanopartículas e os padrões de distribuição, contribuindo com o planejamento de novos sistemas nanoestruturados.

Inúmeras propriedades tais como tamanho, forma, carga e composição química podem influenciar a interação entre nanopartículas e proteínas plasmáticas, a captação celular e a toxicidade (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2009; LUCIANI *et al.*, 2009). A biodistribuição e farmacocinética de nanopartículas inorgânicas com diferenças em algumas propriedades físicas ou químicas vêm sendo avaliadas usando diferentes plataformas tecnológicas. De acordo com trabalho publicado em 2008, nanopartículas de sílica com tamanho médio de 45 nm apresentaram tempo de meia vida ($t_{1/2}$) diferente *in vivo* de acordo com o tipo de ligante de superfície. Nanopartículas de sílica revestidas com PEG (PEG-SiNP) permaneceram na circulação por mais tempo ($t_{1/2} = 180$ minutos) do que nanopartículas de sílica revestidas com grupo funcional hidroxila (OH-SiNP, $t_{1/2} = 80$ minutos) e nanopartículas de sílica revestidas com grupo funcional carboxila (COOH-SiNP, $t_{1/2} = 35$ min). Foi possível detectar a presença de OH-SiNP e COOH-SiNP no fígado três horas após a administração, enquanto nenhum sinal de PEG-SiNP foi detectado neste órgão até 24 horas após a administração (HE *et al.*, 2008), o que indica claramente a influência da química de superfície no tempo de circulação e padrões de distribuição de nanopartículas.

O impacto do tamanho de nanopartículas de ouro revestidas com PEG (PEG-AuNP) na distribuição e eliminação *in vivo* foi investigado por Cho e colaboradores (2010). A concentração de nanopartículas com tamanho entre 4 e 13 nm no sangue permaneceu elevada durante 24 horas enquanto que nanopartículas com tamanho médio de 100 nm foram eliminadas totalmente do sangue em 24 horas (CHO *et al.*, 2010). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, nos quais nanopartículas com diâmetro abaixo de 10 nm mostraram tempo de circulação prolongado (HEATHER e MICHAEL, 2014). Dendrímeros de ouro de 5 nm com carga de superfície negativa e neutra acumularam-se principalmente no fígado e baço enquanto dendrímeros carregados positivamente acumularam-se nos rins e sangue (BALOGH *et al.*, 2007).

Neste trabalho, macrófagos derivados de monócitos primários foram utilizados para determinar a taxa de captação de SPION-PEG2000 objetivando descrever a captação pelo SRE *in vivo*. Os resultados mostrados na Figura 34 sugerem que a captação de SPION-PEG2000 por macrófagos acontece de forma tempo-dependente, com maior captação no tempo de 24 horas, com tratamento de 100 $\mu\text{g/ml}$. De acordo com Thorek e Tsourkas (2008), a extensão da captação de nanopartículas de óxido de ferro é dependente não apenas do tamanho das partículas, mas também da concentração e tempo de exposição (THOREK e TSOURKAS, 2008). Extrapolando a captação *in vitro* para *in vivo*, a concentração também é importante, uma vez que maiores quantidades de nanopartículas no sangue tem maiores chances de serem identificadas e captadas pelo SRE.

Figura 34. Captação de SPION-PEG2000 por macrófagos derivados de monócitos primários.



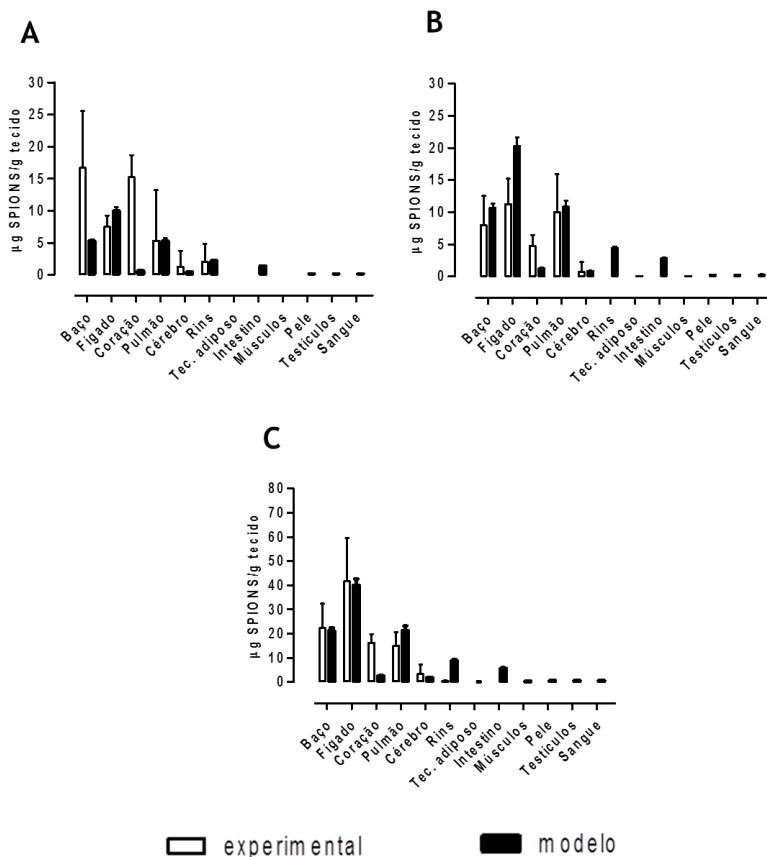
SPION-PEG2000 foram incubadas com as células nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$, pelos tempos de 1, 6 e 24 h. Os dados representam as médias \pm DP de triplicatas derivadas de três ensaios independentes. *** $p < 0.001$.

A taxa de captação de SPION-PEG2000 pelo SRE *in vivo* foi determinada empregando a equação descrita na seção 2.3.1, em materiais e métodos, usando a taxa de captação *in vitro* no tempo de 24 horas e tratamento com 100 $\mu\text{g/ml}$.

O modelo farmacocinético simulado foi comparado com os resultados de acúmulo *in vivo* de SPION-PEG2000 mostrados no capítulo 2 desta tese e estão descritos na Figura 35.

A distribuição e acúmulo de SPION-PEG2000 obtidos por meio do modelo farmacocinético são similares aos resultados obtidos experimentalmente, com maior acúmulo das nanopartículas no baço, fígado e pulmão. As maiores diferenças encontradas foram no coração, em que o acúmulo *in vivo* para as doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg foram maiores do que os obtidos no modelo (13,3 *versus* 0,63 µg/g tecido, 4,27 *versus* 1,28 µg/g tecido e 14,36 *versus* 2,54 µg/g tecido, respectivamente) e nos rins, em que o acúmulo obtido experimentalmente foi menor do que o obtido no modelo (0,98 *versus* 2,18 µg/g tecido, 0,15 *versus* 4,44 µg/g tecido e 0,28 *versus* 8,76 µg/g tecido, respectivamente). Apesar da diferença entre os dados experimentais e os resultados obtidos no modelo, o grande acúmulo de SPION-PEG2000 no coração dos camundongos é similar ao encontrado em outros trabalhos avaliando a farmacocinética de nanopartículas de óxido de ferro (LIU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010), assim como com outras nanopartículas inorgânicas (LEE *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010). O maior acúmulo de SPION-PEG2000 no coração pode estar relacionado com dois mecanismos: (i) o aumento de ferro no sangue, o que por sua vez aumenta o acúmulo de ferro no coração; (ii) a presença de resíduos de sangue no coração, o que poderia explicar também a presença de SPIONS no cérebro, uma vez que não era esperado que essas partículas pudessem atravessar a barreira hematoencefálica.

Figura 35. Resultados obtidos no modelo farmacocinético e *in vivo*.



As doses administradas experimentalmente e no modelo foram de 12,5, 25 e 50 mg/kg, e os resultados estão expressos em microgramas de SPION-PEG2000 por grama de tecido.

O maior acúmulo no baço, fígado e pulmão pode estar associado à formação da coroa de proteínas na superfície das SPIONS, o que facilita a interação com células e tecidos, além de favorecer a captação e acúmulo em células (LESNIAK *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2013). Assim, o padrão de distribuição está de acordo com trabalhos já publicados em que o maior acúmulo de nanopartículas acontece em órgãos ricos em

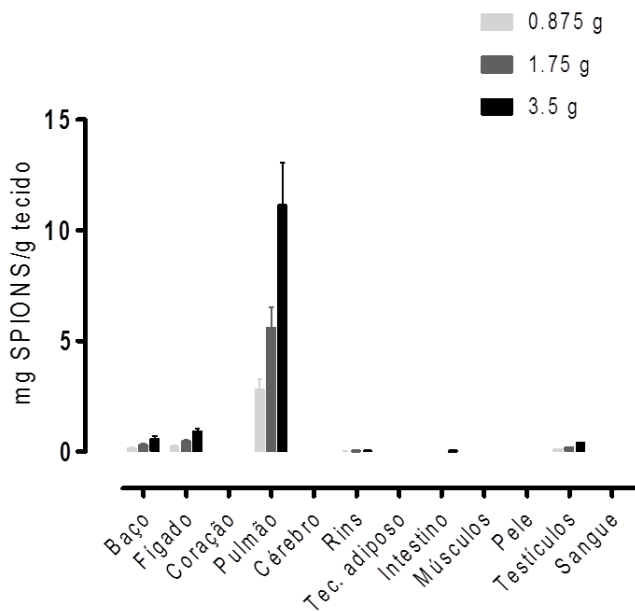
macrófagos, como o baço, fígado e pulmão (JAIN *et al.*, 2008; CHERTOK *et al.*, 2010; COLE *et al.*, 2011).

Macrófagos primários foram usados para determinar a taxa de captação de SPIONS na tentativa de prever a captação pelo SRE *in vivo*. Uma vez que os resultados obtidos no modelo farmacocinético se mostraram similares aos obtidos experimentalmente, pôde-se confirmar a importância deste método *in vitro*, que representa uma valiosa ferramenta na construção de modelos preditivos do comportamento de nanopartículas *in vivo*.

O acúmulo de nanopartículas em células ou tecidos pode desencadear diversos mecanismos, resultando na perturbação da homeostase biológica e/ou dano celular (VISHWAKARMA *et al.*, 2010; SCHADLICH *et al.*, 2012), como já descrito por muitos autores (SIMON-DECKERS *et al.*, 2008; CHO, W. S. *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012). Portanto, a identificação das propriedades das nanopartículas que influenciam a distribuição e acúmulo é essencial e pode ajudar na seleção de plataformas nanotecnológicas e na engenharia de nanopartículas para aplicações biomédicas. Como são escassos os dados na literatura a respeito da farmacocinética de nanopartículas em humanos, uma abordagem teórica da avaliação do risco inerente a esses materiais pode contribuir de forma significativa para o desenvolvimento e aplicação dessa tecnologia de forma segura.

Uma vez que o modelo desenvolvido pôde ser validado com os resultados obtidos *in vivo* em camundongos, desenvolvemos um modelo farmacocinético para predição da distribuição e acúmulo de SPION-PEG2000 também para humanos. Como mostrado na Figura 36, os resultados obtidos no modelo para humanos descreve um resultado semelhante ao obtido em camundongos, com maior acúmulo de nanopartículas no pulmão, fígado e baço. Como esperado, o acúmulo é maior quanto maior é a dose teoricamente administrada. Estes dados devem ser interpretados no contexto de que muitos dos dados usados para construção dos modelos foram os mesmos para camundongos e humanos, com precisão da determinação do acúmulo em camundongos em quatro dos seis tecidos avaliados (considerando um cut-off de 0,5 a 2 vezes). Assim, com uma melhor caracterização dos mecanismos envolvidos na farmacocinética de SPIONS, além de avanços nas metodologias *in vitro* e nos modelos farmacocinéticos, maiores são as chances de sucesso na predição do acúmulo de nanopartículas *in vivo* usando abordagens computacionais.

Figura 36. Avaliação do acúmulo de SPION-PEG2000 em humano obtido por meio do modelo farmacocinético.



A dose administrada teoricamente foi de 0,875, 1,75 e 3,5 gramas de SPIONS por humano, que corresponde à dose administrada em camundongos. Os resultados estão expressos em microgramas de SPIONS por grama de tecido.

4. Conclusões

O modelo desenvolvido para camundongos foi validado com os resultados obtidos com os animais tratados endovenosamente com três diferentes concentrações de SPION-PEG2000. Os resultados de distribuição e acúmulo obtidos com o modelo foram similares aos obtidos *in vivo*, descrevendo um maior acúmulo de SPION-PEG2000 no baço, fígado e pulmão. Esse resultado suporta a ideia do relevante papel dos macrófagos presentes nos tecidos como fígado, baço e pulmão na distribuição e acúmulo das SPIONS *in vivo*. Para inclusão deste parâmetro no modelo desenvolvido, foi considerado o número de

macrófagos em cada órgão e a taxa de fagocitose das SPIONS usando macrófagos primários derivados de monócitos primários humanos, este último sendo determinado *in vitro*. Com base nos resultados obtidos para camundongos, o mesmo modelo foi desenvolvido para humanos, considerando os parâmetros fisiológicos dessa espécie, sendo os resultados similares aos obtidos para animais, com maior acúmulo estimado para o pulmão, baço e fígado. Com isso, a abordagem *in vitro* usada para a construção deste modelo farmacocinético se mostra uma promissora ferramenta na predição computacional do comportamento de nanopartículas *in vivo*.

3 Conclusões gerais

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

- TiO_2 -NPs mostraram ser tóxicas *in vivo* quando administradas intraperitonealmente na dose de 2 mg/kg/dia, durante 10 dias. Apesar da toxicidade de TiO_2 -NPs já ter sido descrita por outros autores, o acúmulo de gordura abdominal e inflamação do tecido adiposo causado pela administração desta nanopartícula até o momento não haviam sido descritos. Estes resultados reafirmam a necessidade de uma avaliação mais criteriosa na determinação da segurança de um material na escala nanométrica, em que resultados ainda não descritos na literatura podem ser encontrados.

- SPION-PEG350 e SPION-PEG2000 mostraram ser promissores sistemas nanoestruturados no carregamento de fármacos ou no tratamento do câncer por hipertermia, especialmente a SPION-PEG2000, uma vez que esta formulação não mostrou toxicidade *in vitro* mesmo na concentração máxima avaliada, além de maior capacidade de penetração e/ou captação pelas células. Os resultados *in vivo* mostram que mesmo após administração endovenosa de 50 mg/kg, estas partículas parecem não causar toxicidade em camundongos, considerando os parâmetros de toxicidade aqui avaliados. Estudos complementares são necessários para determinação da toxicidade de SPION-PEG2000 em tratamentos de longa duração.

- As nanopartículas de PU aqui avaliadas induziram aumento do acúmulo de gordura abdominal e aumento dos níveis séricos de citocinas pró inflamatórias nos animais tratados pela via oral, contrariando a hipótese publicada em trabalho anterior de que este resultado estaria relacionado com a via de administração utilizada, a intraperitoneal. Entretanto, são necessários estudos de toxicidade crônica para avaliação da reversão destes efeitos em longo prazo. Além disso, estes resultados reforçam a necessidade da melhor compreensão dos mecanismos e propriedades físico-químicas dos sistemas nanoestruturados relacionados com a toxicidade.

- Com o desenvolvimento do modelo farmacocinético para predição da distribuição e acúmulo de nanopartículas *in vivo* foi possível demonstrar a promissora utilização desta ferramenta na predição dos efeitos da utilização de nanopartículas, uma vez que os resultados de acúmulo obtidos no modelo foram similares aos obtidos experimentalmente em camundongos e extrapolados coerentemente para humanos. Além disso, demonstramos a possibilidade da utilização de ensaios *in vitro* na predição do papel dos macrófagos presentes em órgãos como fígado, pulmão e baço na captação e acúmulo de nanopartículas *in vivo*.

Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho indicam algumas perspectivas para o futuro:

- Avaliação dos mecanismos envolvidos no acúmulo de gordura no abdômen dos animais tratados com nanopartículas sejam elas poliméricas ou metálicas;
- Avaliação da reversão dependente do tempo no acúmulo de gordura nos animais tratados com nanopartículas;
- Avaliação dos mecanismos envolvidos na captação de nanopartículas *in vitro*;
- Desenvolvimento de um modelo farmacocinético mais abrangente, que possa ser usado para predição da distribuição, metabolismo e excreção de nanopartículas. Para isso um estudo mais completo da farmacocinética *in vivo* deverá ser também realizado em camundongos;

Anexo 1 – Parecer do comitê de ética no uso de animais.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução nº 276/CONSUN/2009

PARECER CONSUBSTANCIADO: 23/05/2012

Data do protocolo: 23/05/2012	Protocolo nº 01/2012
Pesquisador Responsável: Claudriana Locatelli	CPF: 833.281.819-20
Instituição de Origem: Unoesc de Videira	
Título do Projeto: Avaliação de sistema nanoestruturado em modelo in vivo	

<input checked="" type="checkbox"/>	Primeira apresentação para avaliação.
-------------------------------------	---------------------------------------

	Aula Prática	Curso:	Disciplina:
<input checked="" type="checkbox"/>	Atividade de Pesquisa.	Curso: Farmácia	Disciplina: Aluna: Lidiane Caroline Zenaro

PARECER	
<input checked="" type="checkbox"/>	Protocolo Aprovado. <u>Imprescindível</u> a apresentação do relatório final da pesquisa por e-mail. Instruções no site do CEUA.
	Protocolo com pendências: O prazo para o pesquisador responder as observações: 60 (sessenta) dias.
	Protocolo retirado: transcorrido o prazo para correções das pendências.
	Protocolo não aprovado.

Orientações necessárias à realização da pesquisa nas páginas 02 e 03.

Prof. Dr. Jovani Antonio Stoffani
Presidente da Ceua - Unoesc

Apêndice A - Capítulo do Ebook “Temas da Rio +20: desafios e perspectivas”, publicado em mídia eletrônica e apresentado em forma de debate na Rio +20, 2012, no Rio de Janeiro.

NANOTECNOLOGIA: PARADIGMA ENTRE BENEFÍCIOS E RISCOS

Adny Henrique Silva¹, Carine Dal Pizzol¹, Betina Giehl Zanetti Ramos², Tânia Beatriz Creczynski-Pasa³

Sumário: Introdução; 1 Aplicações das nanopartículas; 2 As nanopartículas e o meio ambiente; 2.1 Exposição aos sistemas nanoestruturados; Considerações finais; Referências.

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 dimensões físicas na ordem de alguns nanômetros. A nanotecnologia possui um grande número de aplicações nas mais diversas áreas e já está presente na fabricação de centenas de produtos comercialmente disponíveis. Atualmente, dados estatísticos mostram que mais de 1000 produtos ou linhas de produtos disponíveis no mercado vem utilizando a nanotecnologia na produção. Com o rápido crescimento de novas aplicações, as nanopartículas são produzidas no mundo em grandes quantidades e como consequência, a exposição humana e ao meio ambiente a esses materiais é inevitável e vem aumentando rapidamente. Baseados nestas informações, conclui-se que há uma necessidade urgente de desenvolver metodologias que determinem a toxicidade de substâncias utilizados na preparação de materiais nanoestruturados bem como das estruturas nanométricas, de forma rápida, precisa e eficiente, no intuito de aperfeiçoar a aplicação destes materiais emergentes de maneira segura aos seres vivos e ao meio ambiente.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanociência. Nanotoxicologia.

Apêndice B – Artigo a ser submetido a revista Material Science and Engineering with Advanced Research

Titanium accumulation and visceral fat increase after administration of repeated doses of titanium dioxide nanoparticles in mice

Adny H. Silva^a, Claudriana Locatelli^b, Ubirajara P. R. Filho^c, Bruna F. Gomes^d, Rui M. de Carvalho Júnior^e, Jefferson S. de Gois^e, Daniel L. G. Borges^e and Tânia B. Creczynski-Pasa^a

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88050-005, Brazil; ^bUniversidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC 89560-000, Brazil; ^cInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil; ^dCentro Agroveterinário, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 88502-000, Brazil e ^eDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-970, Brazil.

Abstract

An evaluation of several toxicological-related effects was conducted after intraperitoneal injection of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP) in mice for 10 days. The results showed that the animals' treatment resulted in an increased visceral and abdominal fat deposition, as well as a mononuclear inflammatory infiltration in the abdominal fat tissue. The TiO₂-NP induced significant decrease in the weight gain and significant liver injuries, which were characterized by histopathological and biochemical parameters. Additionally, TiO₂-NP-treated mice showed significant splenomegaly, altered hematological parameters as well as high amount of titanium in the spleen, liver and kidney. These results provide a thorough evaluation of TiO₂-NP toxicity and a discussion about the knowledge pondering this matter. The data obtained are useful for the governmental authorities to legislate and implement regulations concerning the use and the production of this kind of material that might be hazardous to the living beings, as well as to the environment.

Keywords: nanotechnology, nanotoxicology, nanoparticles, titanium dioxide nanoparticles, toxicity, *in vivo*, visceral fat, epididymal fat, subcutaneous fat, inflammation, liver damage, splenomegaly, intraperitoneal route, hematological analysis, biochemical analysis, histopathological analysis, accumulation, environmental release, regulation.

Apêndice C - Artigo a ser submetido a revista Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.

Relationship between protein corona, inflammation and liver injury following administration of polyurethane nanoparticles via different routes.

Adny H. Silva¹, Claudriana Locatelli², Fabiola B. Filippin-Monteiro¹, Philip Martin⁶, Neill J. Liptrott⁶, Betina G. Zanetti-Ramos³, Luana C. Benetti⁴, Celso Pilati⁵, André A. Pasa⁴, Andrew Owen⁶, Tânia B. Creczynski-Pasa^{1*}.

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil; ²Curso de Farmácia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC, 89560-000, Brazil; ³Nanovetores Tecnologia S.A., SC 401, km1, ParqTecAlfa, Florianópolis, SC, 88030-000, Brazil; ⁴Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil; ⁵Centro Agroveterinário, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 88502-000, Brazil; ⁶Department of Molecular and Clinical Pharmacology, University of Liverpool, Liverpool, L693GF, UK.

* Corresponding author. Tel: + 55 48 3721 2212; fax: + 55 48 37219542; e-mail: tania.pasa@ufsc.br; taniabcp@gmail.com;

Abstract

In this work we conducted a series of *in vivo* assays to characterize the biocompatibility of polyurethane nanoparticles, a promising drug delivery system. Additionally, *ex vivo* assays were performed to assess human blood compatibility. Our results indicated that although administration of three different concentrations of polyurethane nanoparticles by oral and intraperitoneal routes did not change mice weight, a significant increase in visceral fat accumulation was observed after oral dosing. In addition, fat tissue of mice intraperitoneally treated with 10 mg/kg/day of nanoparticles showed diffuse mononuclear inflammatory infiltrate in the fat tissue. Histopathological assessment of liver showed moderate vacuolar degeneration and eosinophilic inclusion in hepatocytes of animals treated orally with 5 mg/kg/day of PU-NPs. The same moderate vacuolar degeneration of hepatocytes was observed in mice treated with PU-NPs by *i.p.* administration. Hepatic enzymes related with liver function were significantly increased in both groups of mice treated with PU-NPs. In addition, increased release of proinflammatory cytokines *in vivo*, as well as *ex vivo* with human cells, was observed. Further studies to establish the consequences of long-term exposure to PU-NPs are warranted.

Keywords: Polyurethane nanoparticles, *in vitro*, *in vivo*, toxicity

Apêndice D – Artigo a ser submetido a revista Acta Biomaterialia.

Comparative study between mPEG350- and mPEG2000-coated superparamagnetic iron-oxide nanoparticles: a toxicity approach

Adny H. Silva¹, Enio Lima Jr.², Marcelo Vasquez Mansilla², Roberto D. Zysler², Horacio Troiani², Claudriana Locatelli³, Juan C. Benech⁴, Natalia Oddone⁴, Vinícius C. Zoldan⁵, Evelyn Winter¹, Celso Pilati⁶, André A. Pasa⁵, Tânia B. Creczynski-Pasa^{1*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil; ²Div. Resonancias Magneticas, Centro Atômico Bariloche/CONICET, S. C., Bariloche, 8500 9400, Argentina, ³Curso de Farmácia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC, 89560-000, Brazil, ⁴Inst. de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, 11600, Uruguay, ⁵Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil, ⁶Centro Agroveterinário, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 88502-000, Brazil

* Corresponding author. Tel: + 55 48 3721 2212; fax: + 55 48 37219542; e-mail: tania.pasa@ufsc.br; taniabcp@gmail.com;

Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) were synthesized by thermal decomposition of an organometallic precursor at high temperature and coated with a bi-layer composed of oleic acid and methoxy-polyethylene glycol-phospholipid conjugates (PE-mPEG), with two distinct molecular masses of PEG: 350 Da and 2000 Da. The formulations were named SPION-PEG350 and SPION-PEG2000. Transmission electron microscopy, X-ray diffraction and magnetic measurements show that the SPIONs are near-spherical, well-crystalline, and have high saturation magnetization and susceptibility. FTIR spectroscopy identifies the presence of oleic acid and of the conjugates mPEG for each sample. *In vitro* biocompatibility of SPIONS was investigated using three cell lines; up to 100 µg/ml SPION-PEG350 showed non-toxicity, while SPION-PEG2000 showed no signal of toxicity even up to 200 µg/ml. The uptake of SPIONS was detected using magnetization measurement, confocal and atomic force microscopy. SPION-PEG2000 presented the highest internalization capacity, which should be correlated with the bigger mPEG chain size. Finally, *in vivo* studies showed that even at high doses (50 mg/kg), SPION-PEG2000 do not cause significant toxicity in mice. This study provides data on the safety of SPIONS, crucial for their future medical application.

Keywords: superparamagnetic iron-oxide nanoparticles (SPIONS), uptake, biocompatibility, *in vitro*, *in vivo*

Apêndice E – Artigo submetido a revista Nanotoxicology.

27-Apr-2015

Dear Miss Silva:

Your manuscript entitled "A physiologically based pharmacokinetic model to predict the superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) accumulation in vivo" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Nanotoxicology.

Your manuscript ID is TNAN-2015-0152.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/tnan> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/tnan>.

Nanotoxicology offers an optional fast-track publication service, with a submission to online publication timeline as short as 5–7 weeks (subject to 1–2 week author revision following initial peer-review and prompt turnaround of proofs).

The fee for this service is \$850/ €625/ £550 per published page. (You can estimate the number of published pages based on an average 800 words per page.)

Please note that all manuscripts (whether or not they are prioritised) are subject to strict and rigorous peer review. Acceptance for publication is solely dependent on the peer-review outcome.

If you would like to opt for the fast-track publication service or know more about it, please contact the managing editor, Joris Roulleau (joris.roulleau@informa.com) as soon as possible.

Thank you for submitting your manuscript to Nanotoxicology.

Sincerely,
Nanotoxicology Editorial Office

Apêndice F - Artigo publicado na revista Nanotoxicology.

Nanotoxicology, March 2014; 8(2):212–219
 © 2014 Informa UK, Ltd.
 ISSN: 1743-5390 print / 1743-5404 online
 DOI: 10.3109/17435390.2013.782076

informa
healthcare

Solid lipid nanoparticles induced hematological changes and inflammatory response in mice

Adny Henrique Silva¹, Claudriana Locatelli^{2,4}, Fabíola Branco Filippin-Monteiro¹, Betina G. Zanetti-Ramos³, Aline Conte⁴, & Tânia Beatriz Crezcynski-Pasa¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, P.O. Box 476, Florianópolis, SC, Brazil, ²Curso de Farmácia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC, Brazil, ³Nanoveículos-Encapsulados de Alta Tecnologia, SC 401, km1, ParqTecAlfa, Florianópolis, SC, Brazil and ⁴Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe, Caçador, SC, Brazil

Abstract

Solid lipid nanoparticles (SLNs) are an alternative drug delivery system compared to emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles. Due to their unique sizes and properties, SLNs offer possibility to develop new therapeutic approaches. The ability to incorporate drugs into nanocarriers offers a new prototype in drug delivery that could be used for drug targeting. However, toxicity of these new formulations has not been investigated thus far. In this study, we carried out an *in vivo* toxicity study. For that mice were divided into three groups and treated intraperitoneally with triestein-based SLNs (TN), natural wax-based SLNs (VN) or vehicle for 10 days. After that, necropsies, histopathological and hematological analysis, as well as hepatic and renal functions were performed. Our results indicated that both TN and VN were absorbed post-exposure and induced an inflammatory response in adipose tissue. However, histopathological analysis demonstrated the absence of toxicity in both treated groups. In addition, the body weights were similar among the groups and low toxicity was also indicated by the unchanged serum biochemical parameters. This study provides a preliminary data for toxicological studies of two different SLNs in long-term *in vivo* exposure. However, further studies should be conducted in order to investigate the inflammatory response in order to establish the safety of these SLNs.

Keywords: hepatic and renal function, *in vivo* studies, solid lipid nanoparticles, toxicity

Introduction

Recently, there has been an enormous expansion of research on potential applications of nanotechnology in medicine, including the use of materials structured on a nanometer scale in the delivering and targeting of pharmaceutical products (Brigger et al. 2002; Fadeel & Garcia-Bennett 2010;

Faraji & Wipf 2009), and applications in the medical imaging (Cormode et al. 2010). The combination of active ingredients of known pharmacological activity with systems that can enable them to change and adapt to different physicochemical properties without changing their mechanism of action is an attractive alternative for the treatment of many diseases. The current interest in nanostructured systems reflects the need to release the drug in specific areas of the body, with the aim of increasing their therapeutic index while reducing their side effects. In addition to these benefits, the materials at nanosize scale are also capable of protecting the drug against enzymatic degradation, or even chemical or immunological alterations. The use of nanoparticles as drug carriers may also reduce drug toxicity, thus improving its bioavailability and could help increase adherence to prescribed therapeutic treatment (Brigger et al. 2002; Fadeel & Garcia-Bennett 2010).

Different materials used in the production of nanostructured systems are under investigation for their potential use as drug carriers and drug systems (Moghimi et al. 2005). Materials structured on a nanometer scale have different physicochemical properties compare with the same materials on larger scale. The small size, surface area, chemical composition, surface structure, solubility and shape make these formulations very interesting for application in different areas. However, some apparent advantages of such structures may trigger non-desirable effects with potential impact on the public health as well as on the environment (Aillon et al. 2009; Fadeel & Garcia-Bennett 2010; Rico et al. 2011; Semete et al. 2010b; Stern & McNeil 2008). It is assumed that due to the smaller size of nanostructured systems, which is similar to many biological molecules such as proteins, they can easily cross barriers in cells and organelles (Fadeel & Garcia-Bennett 2010). The design of such structures is determinant for their behavior of these materials *in vitro* and *in vivo* (Gratton et al. 2008).

Apêndice G – Artigo publicado na revista Journal of Biomedical Materials Research b: Applied Biomaterial.



***In vitro* and *in vivo* experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting**

M. L. Mojica Piscioti,¹ E. Lima Jr.,¹ M. Vasquez Mansilla,¹ V. E. Tognoli,¹ H. E. Troiani,² A. A. Pasa,³ T. B. Creczynski-Pasa,⁴ A. H. Silva,⁴ P. Gurman,⁵ L. Colombo,⁶ G. F. Goya,⁷ A. Lamagna,⁵ R. D. Zysler¹

¹Div. Resonancias Magnéticas, Centro Atómico Bariloche/CONICET, S. C. Bariloche 8400, Argentina

²Div. Física de Metales, Centro Atómico Bariloche/CONICET, S. C. Bariloche 8400, Argentina

³Depto. de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil

⁴Depto. de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

⁵Depto. de Micro y Nanotecnología, Centro Atómico Constituyentes, San Martín 1650, Argentina

⁶Instituto de Oncología A.H. Roffo, UBA/CONICET/CAECIHS (UAI), Av. San Martín 5481, (1417) CABA, Argentina

⁷Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza 50018, Spain

Received 16 May 2013; revised 13 September 2013; accepted 20 October 2013

Published online 23 January 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.b.33068

ABSTRACT: In this research work, DEXTRAN- and polyethylene glycol (PEG)-coated iron-oxide superparamagnetic nanoparticles were synthesized and their cytotoxicity and biodistribution assessed. Well-crystalline hydrophobic Fe₃O₄ SPIONs were formed by a thermal decomposition process with $d = 18$ nm and $\sigma = 2$ nm; finally, the character of SPIONs was changed to hydrophilic by a post-synthesis procedure with the functionalization of the SPIONs with PEG or DEXTRAN. The nanoparticles present high saturation magnetization and superparamagnetic behavior at room temperature, and the hydrodynamic diameters of DEXTRAN- and PEG-coated SPIONs were measured as 170 and 120 nm, respectively. PEG- and DEXTRAN-coated SPIONs have a Specific Power Absorption SPA of 320 and 400 W/g, respectively, in an ac magnetic field with amplitude of 13 kA/m and frequency of 256 kHz. *In vitro* studies using VERO and MDCK

cell lineages were performed to study the cytotoxicity and cell uptake of the SPIONs. For both cell lineages, PEG- and DEXTRAN-coated nanoparticles presented high cell viability for concentrations as high as 200 μ g/mL. *In vivo* studies were conducted using BALB/c mice inoculating the SPIONs intravenously and exposing them to the presence of an external magnet located over the tumour. It was observed that the amount of PEG-coated SPIONs in the tumor increased by up to 160% when using the external permanent magnetic as opposed to those animals that were not exposed to the external magnetic field. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 102B: 860–868, 2014.

Key Words: SPIONs quantification, tumors, SPIONs biodistribution, magnetic nanoparticles, hyperthermia, SPIONs biocompatibility, cell uptake, superparamagnetism, mice

How to cite this article: Mojica Piscioti ML, Lima E Jr, Vasquez Mansilla M, Tognoli VE, Troiani HE, Pasa AA, Creczynski-Pasa TB, Silva AH, Gurman P, Colombo L, Goya GF, Lamagna A, Zysler RD. 2014. *In vitro* and *in vivo* experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. *J Biomed Mater Res Part B* 2014;102B:860–868.

Apêndice H – Artigo publicado na revista Toxicology in Vitro.

Toxicology in Vitro 28 (2014) 769–777



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit



Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action



Evelyn Winter^a, Louise Domeneghini Chiaradia^b, Adny Henrique Silva^a, Ricardo José Nunes^b, Rosendo Augusto Yunes^b, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{a,*}

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2013

Accepted 15 February 2014

Available online 26 February 2014

Keywords:

Leukemia

Chalcones

Intrinsic apoptosis

Extrinsic apoptosis

Endoplasmic reticulum

ABSTRACT

Chalcones, naturally occurring open-chain flavonoids abundant in plants, have demonstrated anticancer activity in multiple tumor cells. In a previous work, the potential anticancer activity of three naphthylchalcones named R7, R13 and R15 was shown. In this study, the mechanism of actions of these chalcones was originally shown. The chalcones presented concentration and time-dependent cytotoxicity. To determine the type of cell death induced by chalcones, we assessed a series of assays including measurements of the caspase-8, -9 and -12 activities, expression of important apoptosis-related genes and proteins, changes in the cell calcium concentration and cytochrome c release. The activities of caspase-8, -9 and -12 increased after the treatment of L1210 cells with the three compounds. Chalcones R7 and R13 induced an increase of pro-apoptotic proteins Bax, Bid and Bak (only chalcone R13), as well as a decrease in anti-apoptotic Bcl-2 expression. These chalcones also induced an increase in Fas and a decrease in p21 and p53 expression. Chalcone R15 seems to act by a different mechanism to promote cell death, as it did not change the mitochondrion-related proteins, nor did it induce the cytochrome c release. All compounds induced an increase in cell calcium concentration and an increase in CHOP expression, which together with an increase in caspase-12 activity, suggest that chalcones could induce an endoplasmic reticulum (ER) stress. Taken together, these results suggest that chalcones induce apoptosis by different pathways, being an interesting strategy to suggest for cancer therapy.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Apêndice I – Artigo publicado na revista Chemical Research in Toxicology.

Antitumoral Activity of a Trichloromethyl Pyrimidine Analogue: Molecular Cross-Talk between Intrinsic and Extrinsic Apoptosis

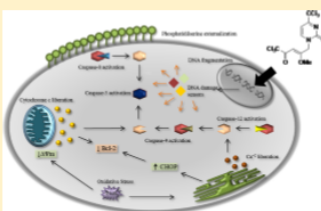
Evelyn Winter,[†] Carine Dal Pizzol,[†] Fabíola B. Filippin-Monteiro,[†] Patrícia Brondani,[‡] Andreia M. P. W. Silva,[‡] Adny H. Silva,[†] Helio G. Bonacorso, Marcos A. P. Martins,[‡] Nilo Zanatta,[‡] and Tânia B. Creczynski-Pasa^{*,†}

[†]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis SC, Brazil

[‡]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS 97105-900, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disorder caused by the proliferation of lymphoid progenitor cells and is the most common cancer in children. Cytotoxic nucleoside analogues are important chemotherapeutic agents, which are used in many cancers, including leukemias. In this study, we investigated the effects of the synthetic nucleoside analogue 1-(5,5,5-trichloro-2-methoxy-4-oxopent-2-yl)-4-trichloromethyl-pyrimidin-2(1H)-one, named compound 3 or C3, on leukemia cell lines. The compound stimulated cell death by apoptosis, evidenced by DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization, and caspase-3 activation. Compound 3 seemed to trigger several cell death pathways. The mitochondrial pathway was evidenced through a disturbance of mitochondrial membrane potential, strong cytochrome *c* liberation, decrease of antiapoptotic Bcl-2 protein expression, and caspase-9 activation. The C3 also induced caspase-8 and -12 activation, an increase in the intracellular calcium level, and an overproduction of reactive oxygen species. Increased caspase 8 activity suggests that the extrinsic pathway was activated and that the ROS production and enzyme activity alteration (glutathione *S*-transferase, glutathione peroxidase, catalase, and glutathione reductase) might be related to oxidative stress. Finally, the increase in calcium release, CHOP expression, and caspase-12 activity might characterize endoplasmic reticulum stress. Compound 3 was likewise cytotoxic to leukemic and melanoma human cell lines. Taken together, the results contribute to further understanding the new pyrimidine analogue as a potential chemotherapeutic drug or lead molecule.



Apêndice J – Artigo publicado na revista International Journal of Environmental Research and Public Health.

Int. J. Environ. Res. Public Health **2014**, *11*, 8581–8596; doi:10.3390/ijerph110808581

OPEN ACCESS

International Journal of
Environmental Research and
Public Health
ISSN 1660-4601
www.mdpi.com/journal/ijerph

Article

Influence of Surfactant and Lipid Type on the Physicochemical Properties and Biocompatibility of Solid Lipid Nanoparticles

Carine Dal Pizzol^{1†}, Fabíla Branco Filippin-Monteiro^{1†}, Jelver Alexander Sierra Restrepo², Frederico Pittella³, Adny Henrique Silva¹, Paula Alves de Souza¹, Angela Machado de Campos¹ and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{1,*}

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil; E-Mails: carine@dalpizzol.com (C.D.P.); filippinmonteiro@gmail.com (F.B.F.-M.); adnyh@yahoo.com.br (A.H.S.); paula.as@hotmail.com (P.A.S.); angelacampos@ufsc.br (A.M.C.)

² Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil; E-Mail: jelver.sierra@gmail.com

³ Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil; E-Mail: fredpittella@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: tania.pasa@ufsc.br; Tel.: +55-48-3721-2212; Fax: +55-48-3721-9542.

Received: 30 June 2014; in revised form: 4 August 2014 / Accepted: 12 August 2014 / Published: 20 August 2014

Apêndice K - Artigo publicado na revista International Journal of Environmental Research and Public Health.

Int. J. Environ. Res. Public Health **2014**, *11*, 10016-10035; doi:10.3390/ijerph111010016

OPEN ACCESS

International Journal of
Environmental Research and
Public Health
ISSN 1660-4601
www.mdpi.com/journal/ijerph

Article

***In vitro* and *in vivo* Effects of Free and Chalcones-Loaded Nanoemulsions: Insights and Challenges in Targeted Cancer Chemotherapies**

Evelyn Winter ¹, Carine Dal Pizzol ¹, Claudriana Locatelli ², Adny H. Silva ¹, Aline Conte ², Louise D. Chiaradia-Delatorre ³, Ricardo J. Nunes ³, Rosendo A. Yunes ³ and Tânia B. Creckzynski-Pasa ^{1,*}

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, P.O. Box 476, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil; E-Mails: eve_winter@hotmail.com (E.W.) carinedp@gmail.com (C.D.P.); adnyh@yahoo.com.br (A.H.S.)

² Department of Pharmacy, University of West of Santa Catarina, Videira, SC 89560-000, Brazil; E-Mails: claudrilocatelli@gmail.com (C.L.); alineconte91@gmail.com (A.C.)

³ Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, P.O. Box 476, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil; E-Mails: louisedc@gmail.com (L.D.C.-D.); nunesricardoj@gmail.com (R.J.N.); ryunes@msn.com (R.A.Y.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mails: tania.pasa@ufsc.br or taniabcp@gmail.com; Tel.: +55-48-3221-2212; Fax: +55-48-3721-9542.

Referências

- AGASTI, S. S. et al. Nanoparticles for detection and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, p. 316-328, 2010.
- AITKEN, R. J.; CREELY, K. S.; TRAN, C. L. **Nanoparticles: An occupational hygiene review**. Institute of occupational medicine. Research report 274, 2004.
- AKIRA, S. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). **The FASEB Journal**, v. 4, n. 11, p. 2860-2867, 1990.
- ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012.
- BACHLER, G.; VON GOETZ, N.; HUNGERBÜHLER, K. A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3365-3382, 2013.
- BALOGH, L. et al. Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models. **Nanomedicine**, v. 3, n. 4, p. 281-296, 2007.
- BARTNECK, M. et al. Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages. **Nanomedicine**, v. 10, n. 6, p. 1209-1220, 2014.
- BELADE, E. et al. A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 1, p. 57-66, 2012.
- BENN, T. M.; WESTERHOFF, P.; HERCKES, P. Detection of fullerenes (C60 and C70) in commercial cosmetics. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 5, p. 1334-1342, 2011.

BERNARD, F. X. et al. Development of a highly sensitive in vitro phototoxicity assay using the SkinEthic reconstructed human epidermis. **Cell Biol Toxicol**, v. 16, n. 6, p. 391-400, 2000.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 8, 1968.

BONZANI, I. C. et al. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 3, p. 423-433, 2007.

BORM, P. J. et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. In: (Ed.). **Part Fibre Toxicol**. England, v.3, p.35, 2006.

BOSGRA, S. et al. An improved model to predict physiologically based model parameters and their inter-individual variability from anthropometry. **Crit Rev Toxicol**, v. 42, n. 9, p. 751-767, 2012.

BOTELHO, M. C. et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles in human gastric epithelial cells in vitro. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 1, p. 59-64, 2014.

BRAHIM, S.; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, n. 1-2, p. 27-36, 2001.

BROME, J.; LI, Q.; ALVAREZ, P. J. J. Nanotechnology-enabled water treatment and reuse: emerging opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 618-624, 2011.

BURLESON, D. J.; DRIESSEN, M. D.; PENN, R. L. On the characterization of environmental nanoparticles. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**, v. 39, n. 10, p. 2707-2753, 2004.

BUZEA, C.; PACHECO, I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p.17-172, 2007.

BYRNE, C. D. Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4–6, p. 265-271, 2010.

CAMNER, P. et al. Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages. **J Appl Physiol**, v. 92, n. 6, p. 2608-16, 2002.

CHAMAKURA, K. et al. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 88-96, 2011.

CHANG, H. et al. Involvement of MyD88 in zinc oxide nanoparticle-induced lung inflammation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 6, p. 887-896, 2013.

CHELLARAM, C. et al. Significance of Nanotechnology in Food Industry. **APCBEE Procedia**, v. 8, n. 0, p. 109-113, 2014.

CHEN, T.; YAN, J.; LI, Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 95-104, 2014.

CHEN, Z. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 2, p. 109-120, 2006.

CHERTOK, B. et al. Comparison of electron spin resonance spectroscopy and inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy for biodistribution analysis of iron-oxide nanoparticles. **Mol Pharm**, v. 7, n. 2, p. 375-385, 2010.

CHO, W. S. et al. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 236, n. 1, p. 16-24, 2009.

CHO, W. S. et al. Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 245, n. 1, p. 116-123, 2010.

- COHEN, D. et al. Evaluation of topically applied copper(II) oxide nanoparticle cytotoxicity in human skin organ culture. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 292-298, 2013.
- COLE, A. J. et al. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6291-301, 2011.
- COPPLE, B. L.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 190, n. 3, p. 155-169, 2003.
- COUNCIL, N. S. A. T. **The national nanotechnology initiative - strategic planning stakeholder workshop**. Arlington, Virginia, p.70, 2010.
- CRUZ, L. J. et al. The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 28, p. 6791-6803, 2011.
- CUI, Y. et al. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. **Chemosphere**, v. 96, n. 0, p. 99-104, 2014.
- DAOU, T. J. et al. Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots. **Langmuir**, v. 25, n. 5, p. 3040-4, 2009.
- DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 6, p. 907-938, 1999.
- DAVIES, L. C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 986-995, 2013.
- DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 2, p. 589-605, 2010.
- DÍAZ-MOSCOSO, A. Soft versus hard nanoparticles in the delivery of aromatic macrocycles for photodynamic therapy of cancer.

International Journal of Medicine and Biomedical Research, v. 1, n. 1, p. 11, 2012.

DING, M. et al. Cellular uptake of polyurethane nanocarriers mediated by gemini quaternary ammonium. **Biomaterials**, v. 32, n. 35, p. 9515-9524, 2011.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Mol Pharm**, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 106-117, 2009.

DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. **Occupational Environmental Medicine**, v. 61, p. 2, 2004.

DONALDSON, K. et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. In: (Ed.). **Part Fibre Toxicol**. England, v.2, p.10, 2005.

DREADEN, E. C. et al. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. **Ther Deliv**, v. 3, n. 4, p. 457-478, 2012.

DU, J. et al. Understanding the toxicity of carbon nanotubes in the environment is crucial to the control of nanomaterials in producing and processing and the assessment of health risk for human: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 451-462, 2013.

DUNCAN, R.; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the Microscope. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2101-2141, 2011.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1-24, 2011.

- DUNLOP, P. S. M. et al. The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 148, n. 1–3, p. 355-363, 2002.
- EHRENBERG, M. S. et al. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 603-610, 2009.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 168-182, 2012.
- European commission. Disponível em: <
http://ec.europa.eu/index_en.htm>. 2015. Acessado em: 11 fev.2015.
- FABIAN, E. et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 3, p. 151-157, 2008.
- FADEEL, B.; GARCIA-BENNETT, A. E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 3, p. 362-374, 2010.
- FAINBOIM, L. et al. Cytokines and chronic liver disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 1–2, p. 143-157, 2007.
- FAKO, V. E.; FURGESON, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 478-486, 2009.
- FANG, C.; ZHANG, M. Nanoparticle-based theragnostics: Integrating diagnostic and therapeutic potentials in nanomedicine. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 1, p. 2-5, 2010.
- FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FLEISCHER, C. C.; KUMAR, U.; PAYNE, C. K. Cellular Binding of Anionic Nanoparticles is Inhibited by Serum Proteins Independent of Nanoparticle Composition. **Biomater Sci**, v. 1, n. 9, p. 975-982, 2013.

FOUDA, M. M. G.; ABDEL-HALIM, E. S.; AL-DEYAB, S. S. Antibacterial modification of cotton using nanotechnology. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 943-954, 2013.

FRIEDMAN, S. L. et al. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. **Hepatology**, v. 15, n. 2, p. 234-43, 1992.

FUDOZI, H.; XIA, Y. Photonic Papers and Inks: Color Writing with Colorless Materials. **Advanced Materials**, v. 15, n. 11, p. 892-896, 2003.

GAJEWICZ, A. et al. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 15, p. 1663-1693, 2012.

GAMER, A. O.; LEIBOLD, E.; VAN RAVENZWAAY, B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. **Toxicol In Vitro**, v. 20, n. 3, p. 301-7, 2006.

GAUR, U. et al. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. In: (Ed.). **Int J Pharm**. Netherlands, v.202, p.1-10, 2000.

GOPINATH, P. et al. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 2, p. 240-245, 2010.

GRUNKEMEIER, J. M.; TSAI, W. B.; HORBETT, T. A. Hemocompatibility of treated polystyrene substrates: contact activation, platelet adhesion, and procoagulant activity of adherent platelets. **J Biomed Mater Res**, v. 41, n. 4, p. 657-670, 1998.

- HAM, S. et al. Task-based exposure assessment of nanoparticles in the workplace. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, p. 1-17, 2012.
- HAN, X. et al. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. **Toxicology**, v. 287, n. 1–3, p. 99-104, 2011.
- HAUCK, T. S. et al. In vivo quantum-dot toxicity assessment. **Small**, v. 6, n. 1, p. 138-144, 2010.
- HAUERT, S.; BHATIA, S. N. Mechanisms of cooperation in cancer nanomedicine: towards systems nanotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 32, n. 9, p. 448-455, 2014.
- HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657-3666, 2010.
- HE, X. et al. In Vivo Study of Biodistribution and Urinary Excretion of Surface-Modified Silica Nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9597-9603, 2008.
- HEATHER, A. E.; MICHAEL, A. M. Detection Methods for the In Vivo Biodistribution of Iron Oxide and Silica Nanoparticles. **Nanotoxicology**, p.177-200, 2014.
- HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. **IEE Proc Nanobiotechnol**, v. 152, n. 1, p. 33-39, 2005.
- HIRN, S. et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 407-416, 2011.
- HIURA, T. S. et al. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. **J Immunol**, v. 165, n. 5, p. 2703-2711, 2000.
- HOET, P. H.; NEMMAR, A.; NEMERY, B. Health impact of nanomaterials? **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 1, p. 19, 2004.

HOLPUCH, A. S. et al. Nanoparticles for local drug delivery to the oral mucosa: proof of principle studies. **Pharm Res**, v. 27, n. 7, p. 1224-1236, 2010.

HOYT, V. W.; MASON, E. Nanotechnology: Emerging health issues. **Journal of Chemical Health and Safety**, v. 15, n. 2, p. 10-15, 2008.

HUANG, Y. W.; WU, H. C.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. **Materials**, v. 3, p. 18, 2010.

HUERTA-GARCÍA, E. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, n. 0, p. 84-94, 2014.

HUGHES, J. M. et al. Cohort Mortality Study of North American Industrial Sand Workers. II. Case-referent Analysis of Lung Cancer and Silicosis Deaths. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 45, n. 3, p. 201-207, 2001.

HUSSAIN, S. et al. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. **Toxicology**, v. 260, n. 1-3, p. 142-149, 2009.

ILINSKAYA, A. N.; DOBROVOLSKAIA, M. A. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. **Nanomedicine (Lond)**, v. 8, n. 6, p. 969-981, 2013.

INDULEKHA, K. et al. Association of visceral and subcutaneous fat with glucose intolerance, insulin resistance, adipocytokines and inflammatory markers in Asian Indians (CURES-113). **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 281-287, 2011.

ISHIDA, T.; HARASHIMA, H.; KIWADA, H. Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. **Curr Drug Metab**, v. 2, n. 4, p. 397-409, 2001.

IVANOV, S. et al. In Vivo Toxicity of Intravenously Administered Silica and Silicon Nanoparticles. **Materials**, v. 5, n. 10, p. 16, 2012.

JAIN, T. K. et al. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. **Mol Pharm**, v. 5, n. 2, p. 316-27, 2008.

JANG, J.; OH, J. H. Novel crystalline supramolecular assemblies of amorphous polypyrrole nanoparticles through surfactant templating. **Chem Commun (Camb)**, n. 19, p. 2200-2201, 2002.

JIN, C.-Y. et al. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1871-1877, 2008.

JO, H. J. et al. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227-228, n. 0, p. 301-308, 2012.

JOKERST, J. V. et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine (Lond)**, v. 6, n. 4, p. 715-728, 2011.

JOSHI, M. D.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 71, n. 2, p. 161-172, 2009.

JULIANO, R. L. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 2, n. 1, p. 31-54, 1988.

KARMAKAR, R.; BHATTACHARYA, R.; CHATTERJEE, M. Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice. **Biometals**, v. 13, n. 3, p. 231-9, 2000.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2005.

KHARGHARIA, S. et al. PEG length and chemical linkage controls polyacridine peptide DNA polyplex pharmacokinetics, biodistribution,

metabolic stability and in vivo gene expression. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 325-333, 2013.

KIEVIT, F. M.; ZHANG, M. Cancer nanotheranostics: improving imaging and therapy by targeted delivery across biological barriers. **Adv Mater**, v. 23, n. 36, p. 217-47, 2011.

KOZIARA, J. M. et al. Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles. **Pharm Res**, v. 22, n. 11, p. 1821-1828, 2005.

KROLL, A. et al. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 72, n. 2, p. 370-377, 2009.

KUMAR, R. et al. In Vivo Biodistribution and Clearance Studies Using Multimodal Organically Modified Silica Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, n. 2, p. 699-708, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LACONTE, L. E. et al. Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity. **J Magn Reson Imaging**, v. 26, n. 6, p. 1634-1641, 2007.

LANKVELD, D. P. et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. **Biomaterials**, v. 31, n. 32, p. 8350-8361, 2010.

LASCHKE, M. W. et al. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 1991-2001, 2009.

LEE, C.-H. et al. Near-Infrared Mesoporous Silica Nanoparticles for Optical Imaging: Characterization and In Vivo Biodistribution. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 2, p. 215-222, 2009.

LELIEVRE, D. et al. The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an in vitro tiered strategy using 17 reference chemicals

to predict phototoxic potency. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 6, p. 977-995, 2007.

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clin Chem**, v. 51, n. 12, p. 2415-2418, 2005.

LEROUX, J. C. et al. Biodegradable nanoparticles - From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 2-3, p. 339-350, 1996.

LESNIAK, A. et al. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5845-5857, 2012.

LEWICKA, Z. A. et al. Photochemical Behavior of Nanoscale TiO₂ and ZnO Sunscreen Ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 263, n. 0, p. 24-33, 2013.

LI, M. et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, n. 11, p. 6303-6317, 2010.

LINKOV, I. et al. Emerging methods and tools for environmental risk assessment, decision-making, and policy for nanomaterials: summary of NATO Advanced Research Workshop. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 3, p. 513-527, 2009.

LIONG, M. et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug. **ACS Nano**, v. 2, n. 5, p. 889-896, 2008.

LIPKA, J. et al. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. **Biomaterials**, v. 31, n. 25, p. 6574-6581, 2010.

LIPTROTT, N. J. et al. Flow cytometric analysis of the physical and protein-binding characteristics of solid drug nanoparticle suspensions. **Nanomedicine (Lond)**, p. 1-15, 2014.

LISON, D.; VIETTI, G.; VAN DEN BRULE, S. Paracelsus in nanotoxicology. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-4, 2014.

LIU, R. et al. Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 5, p. 573-579, 2009.

LIU, S. et al. Toxicology Studies of a Superparamagnetic iron oxide nanoparticle in vivo. **Advanced Materials Research**, v. 47-50, p. 1097-1100, 2008.

LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 3, p. 870-879, 2012.

LOZANO, O. et al. Effects of SiC nanoparticles orally administered in a rat model: Biodistribution, toxicity and elemental composition changes in feces and organs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 232-245, 2012.

LUCIANI, N.; GAZEAU, F.; WILHELM, C. Reactivity of the monocyte/macrophage system to superparamagnetic anionic nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6373-6380, 2009.

LUQUE-GARCIA, J. L. et al. Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 0, p. 254-268, 2013.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano Today**, v. 3, n. 1-2, p. 40-47, 2008.

LYNCH, I.; SALVATI, A.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 9, p. 546-547, 2009.

MAHMOUDI, M. et al. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J Colloid Interface Sci**, v. 336, n. 2, p. 510-518, 2009.

MAO, S. et al. Influence of Polyethylene Glycol Chain Length on the Physicochemical and Biological Properties of Poly(ethylene imine)-graft-Poly(ethylene glycol) Block Copolymer/SiRNA Polyplexes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 1209-1218, 2006.

- MARTINS, S. et al. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 216-227, 2012.
- MAYNARD, A. D. et al. Safe handling of nanotechnology. **Nature**, v. 444, p. 3, 2006.
- MCCARRON, P. A. et al. Bioadhesive, non-drug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2399-2407, 2004.
- MCCARTHY, J. R.; WEISSLEDER, R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1241-1251, 2008.
- MENARD, A.; DROBNE, D.; JEMEC, A. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. **Environ Pollut**, v. 159, n. 3, p. 677-684, 2011.
- MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 149-167, 2014.
- MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 2012.
- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.
- MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 6, p. 463-478, 2003.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O.; ZHANG, L. W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered

nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, n. 2, p. 222-235, 2009.

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

MOSQUEIRA, V. C. et al. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. **Pharm Res**, v. 18, n. 10, p. 1411-1219, 2001.

MOSS, D. M.; SICCARDI, M. Optimizing nanomedicine pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetics modelling. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 17, p. 3963-3979, 2014.

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

NAIR, S. et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. **J Mater Sci Mater Med**, v. 20 Suppl 1, p. 235-241, 2009.

NAVARRO, E. et al. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 23, p. 8959-8964, 2008.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NEMERY, B.; LEWIS, C. P. L.; DEMEDTS, M. Cobalt and possible oxidant-mediated toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 150, n. 1-3, p. 57-64, 1994.

NEUPANE, Y. R. et al. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: Formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. **Int J Pharm**, v. 477, n. 1-2, p. 601-612, 2014.

NIELSEN, F. H. Silicon deprivation does not significantly modify the acute white blood cell response but does modify tissue mineral

distribution response to an endotoxin challenge. **Biol Trace Elem Res**, v. 135, n. 1-3, p. 45-55, 2010.

NOHYNEK, G. J. et al. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 239-259, 2010.

NYMARK, P. et al. Molecular and genetic changes in asbestos-related lung cancer. **Cancer Letters**, v. 265, n. 1, p. 1-15, 2008.

OBERDORSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J Intern Med**, v. 267, n. 1, p. 89-105, 2010.

OBERDÖRSTER, G.; FERIN, J.; LEHNERT, B. E. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. **Environ Health Perspect**, v. 102 Suppl 5, p. 9, 1994.

OBERDORSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Part Fibre Toxicol**. v. 2, p.8, 2005.

OECD. **Important issues on risk assessment of manufactured nanomaterials**. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 33. Paris, 2012.

OSUCHOWSKI, M. F. et al. Sequential ELISA to profile multiple cytokines from small volumes. **Journal of Immunological Methods**, v. 302, n. 1-2, p. 172-181, 2005.

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PACHECO, P. M. et al. Tunable complement activation by particles with variable size and fc density. **Nano Life**, v. 3, n. 2, p. 20, 2013.

PARK, E.-J.; PARK, K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. **Toxicology Letters**, v. 184, n. 1, p. 18-25, 2009.

PARK, E.-J. et al. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. **Toxicology**, v. 260, n. 1–3, p. 37-46, 2009.

PARK, Y. et al. Stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles at different pH values: experimental and theoretical analysis. **Langmuir**, v. 28, n. 15, p. 6246-6255, 2012.

PARK, Y. C. et al. Effect of PEG molecular weight on stability, T(2) contrast, cytotoxicity, and cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 119, p. 106-114, 2014.

PAUL, S. D. et al. An Ex vivo study of Amphotericin-B Nanoparticle for Ocular Delivery **British Biomedical Bulletin**, v. 1, n. 2, p. 7, 2013.

PAUR, H.-R. et al. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. **Journal of Aerosol Science**, v. 42, n. 10, p. 668-692, 2011.

PEN. PEN - The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponível em: <http://www.nanotechproject.org/>. Acessado em: 10 dez. 2014.

PENG, Q. et al. Nanocomplex based on biocompatible phospholipids and albumin for long-circulation applications. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 6, n. 16, p. 7, 2014.

PENG, X. et al. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. **Aquatic Toxicology**, v. 102, n. 3–4, p. 186-196, 2011.

PETERS, T. S. Do preclinical testing strategies help predict human hepatotoxic potentials? **Toxicol Pathol**, v. 33, n. 1, p. 146-54, 2005.

PETERSEN, S. et al. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 150-161, 2011.

PLAPIED, L. et al. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228-237, 2011.

PODILA, R. et al. Effects of surface functional groups on the formation of nanoparticle-protein corona. **Applied Physics Letters**, v. 101, n. 26, 2012.

PORTES, P. et al. Use of human reconstituted epidermis Episkin for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 18, n. 2, p. 96-102, 2002.

QIN, X. Y.; KIM, J. G.; LEE, J. S. Synthesis and magnetic properties of nanostructured γ -Ni-Fe alloys. **Nanostructured Materials**, v. 11, n. 2, p. 259-270, 1999.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n. 3, p. 321-339, 2001.

QU, X.; ALVAREZ, P. J. J.; LI, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, n. 12, p. 3931-3946, 2013.

RABOLLI, V. et al. The cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles is mainly influenced by surface area and not by aggregation. **Toxicology Letters**, v. 206, n. 2, p. 197-203, 2011.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RAY, C. A. et al. Optimization of analytical and pre-analytical variables associated with an ex vivo cytokine secretion assay. **J Pharm Biomed Anal**, v. 41, n. 1, p. 189-95, 2006.

RE, F.; MORESCO, R.; MASSERINI, M. Nanoparticles for neuroimaging. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 45, n. 7, p. 073001, 2012.

REUS, A. A.; USTA, M.; KRUL, C. A. M. The use of ex vivo human skin tissue for genotoxicity testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 261, n. 2, p. 154-163, 2012.

RIEMER, J. et al. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. **Anal Biochem**, v. 331, n. 2, p. 370-375, 004.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 4, p. 459-476, 2002.

ROCO, M. C. M., C. A.; HERSAM, M. C. E. **Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: retrospective and outlook. WorldTechnology Evaluation Center (WTEC) and the National Science Foundation (NSF), Springer.** p.548, 2010.

ROZMAN, K. K.; DOULL, J. Paracelsus, Haber and Arndt. In: (Ed.). **Toxicology**, v.160, p.191-196, 2001.

ROZMAN, K. K.; DOULL, J.; HAYES JR, W. J. Chapter 1 - Dose and Time Determining, and Other Factors Influencing, Toxicity. In: KRIEGER, R. (Ed.). **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2010. p.3-101.

RUSSELL, R. W. Essential roles for animal models in understanding human toxicities. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 15, n. 1, p. 7-11, 1991.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.

SAGER, T.; KOMMINENI, C.; CASTRANOVA, V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 17, 2008.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SAKODA, A. et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Inhaled Radon to Calculate Absorbed Doses in Mice, Rats, and Humans. **Journal of Nuclear Science and Technology**, v. 47, n. 8, p. 731-738, 2010.

SAVOLAINEN, K. et al. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-a review. In: (Ed.). **Toxicology**, v.269, p.92-104, 2010.

SAYES, C. M.; WARHEIT, D. B. Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 1, n. 6, p. 660-670, 2009.

SCHADLICH, A. et al. Accumulation of nanocarriers in the ovary: a neglected toxicity risk? **J Control Release**, v. 160, n. 1, p. 105-12, 2012.

SCHULZ, J. et al. Distribution of sunscreens on skin. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54 Suppl 1, p. 157-163, 2002.

SEATON, A. et al. Nanoparticles, human health hazard and regulation. **J R Soc Interface**, v. 7 Suppl 1, p. 119-129, 2010.

SHEVTSOV, M. A. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (SPION-EGF) for targeting brain tumors. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 273-287, 2014.

SHI, J. et al. Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: Effect of particle size. **Aquatic Toxicology**, v. 132-133, n. 0, p. 53-60, 2013.

SHINDE, S. K. et al. Toxicity induced by nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 4, p. 331-334, 2012.

SILVA, A. H. **Estratégias para Avaliação da Toxicidade de Sistemas Nanoestruturados**. 2011. 142 (Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, A. H. et al. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Science of The Total Environment**, v. 432, n. 0, p. 382-388 2012.

SILVA, A. H. et al. Solid lipid nanoparticles induced hematological changes and inflammatory response in mice. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 7, 2013.

SIMON-DECKERS, A. et al. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. **Toxicology**, v. 253, n. 1-3, p. 137-46, 2008.

SIMONCIC, B.; TOMSIC, B. Structures of Novel Antimicrobial Agents for Textiles - A Review. **Textile Research Journal**, v. 80, n. 16, p. 1721-1737, 2010.

SINGH, R.; LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 416-427, 2013.

STERN, S. T.; MCNEIL, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. **Toxicol Sci**, v. 101, n. 1, p. 4-21, 2008.

SU, Y. et al. In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. **Biomaterials**, v. 32, n. 25, p. 5855-5862, 2011.

SUN, L. et al. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 1619-1629, 2011.

SUN, X. et al. Biodegradable and temperature-responsive polyurethanes for adriamycin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, n. 1-2, p. 52-58, 2011.

TEEGUARDEN, J. G. et al. Particokinetics In Vitro: Dosimetry Considerations for In Vitro Nanoparticle Toxicity Assessments. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 2, p. 300-312, 2007.

THOREK, D. L.; TSOURKAS, A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. **Biomaterials**, v. 29, n. 26, p. 3583-3590, 2008.

UPADHYAY, D. et al. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, n. 2, p. 180-187, 2003.

VAN DER MERWE, D. et al. Nanocrystalline titanium dioxide and magnesium oxide in vitro dermal absorption in human skin. **Cutan Ocul Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 78-82, 2009.

VAN VLERKEN, L. E.; VYAS, T. K.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. **Pharm Res**, v. 24, n. 8, p. 1405-1414, 2007.

VENKATARAMAN, S. et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 14-15, p. 1228-1246, 2011.

VERONESE, F. M. **PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications: Basic Science and Clinical Applications**. Springer 2009.

VERONESE, F. M.; PASUT, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 21, p. 1451-1458, 2005.

VIDEIRA, M.; ALMEIDA, A. J.; FABRA, À. Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 7, p. 07, 2012.

VISHWAKARMA, V.; SAMAL, S. S.; MANOHARAN, N. Safety and Risk Associated with Nanoparticles - A Review. **Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering**, v. 9, n. 5, p. 4, 2010.

WANG, A. et al. Temperature- and pH-responsive nanoparticles of biocompatible polyurethanes for doxorubicin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 30-39, 2013.

- WANG, A. Z.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. In: CASKEY, C. T.; AUSTIN, C. P., *et al* (Ed.). **Annual Review of Medicine**, v.63, p.185-198, 2012.
- WANG, J. et al. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles in mice. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 861-866, 2010.
- WANG, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicol Lett**, v. 168, n. 2, p. 176-185, 2007.
- WANG, S. et al. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, v. 463, n. 1-3, p. 145-149, 2008.
- WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011.
- WANG, Y. X. et al. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. **Pharm Res**, v. 21, n. 8, p. 1362-1373, 2004.
- WEBSTER, T. J.; SIEGEL, R. W.; BIZIOS, R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 20, n. 13, p. 1221-1227, 1999.
- WEISSLEDER, R. et al. Long-circulating iron oxides for MR imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 321-334, 1995.
- WIESNER, M. R. et al. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. **Environ Sci Technol**, v. 40, n. 14, p. 4336-4345, 2006.
- XU, Q. et al. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. **J Control Release**, v. 167, n. 1, p. 76-84, 2013.
- XUE, C.-H. et al. Superhydrophobic surfaces on cotton textiles by complex coating of silica nanoparticles and hydrophobization. **Thin Solid Films**, v. 517, n. 16, p. 4593-4598, 2009.

- YALLAPU, M. M. et al. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 46, n. 0, p. 1-12, 2015.
- YAN, Y. et al. Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. **ACS Nano**, v. 7, n. 12, p. 10960-10970, 2013.
- YOKEL, R. A.; MACPHAIL, R. C. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 6, n. 7, p. 27, 2011.
- YOU, D. et al. Microwave-assisted functionalization of polyurethane surface for improving blood compatibility. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 5, p.1587-1592, 2013.
- YUAN, J.; LIN, S.; SHEN, J. Enhanced blood compatibility of polyurethane functionalized with sulfobetaine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 90-95, 2008.
- ZAMBAUX, M. F. et al. Involvement of neutrophilic granulocytes in the uptake of biodegradable non-stealth and stealth nanoparticles in guinea pig. **Biomaterials**, v. 21, n. 10, p. 975-980, 2000.
- ZANETTI-RAMOS, B. G. et al. Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique. **Polymer**, v. 47, n. 24, p. 8080-8087, 2006.
- ZHANG, F. et al. Whole-body physiologically based pharmacokinetic model for nutlin-3a in mice after intravenous and oral administration. **Drug Metab Dispos**, v. 39, n. 1, p. 15-21, 2011.
- ZHANG, Q.; CHUANG, K. T. Adsorption of organic pollutants from effluents of a Kraft pulp mill on activated carbon and polymer resin. **Advances in Environmental Research**, v. 5, n. 3, p. 251-258, 2001.
- ZHANG, X. et al. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 5, p. 632-638, 2012.

ZHU, M. T. et al. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. **Toxicol Sci**, v. 107, n. 2, p. 342-351, 2009.

ZYSLER, R. D. et al. A new quantitative method to determine the uptake of SPIONs in animal tissue and its application to determine the quantity of nanoparticles in the liver and lung of Balb-c mice exposed to the SPIONs. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, n. 1, p. 142-145, 2013.