

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação toxicológica in vivo de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis

RACHEL PICADA BULCÃO

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação toxicológica *in vivo* de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis

Tese apresentada por **Rachel Picada Bulcão**, como requisito para obtenção do Título de **DOUTOR** em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia
Co-orientadora: Prof^a. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 25.03.2013 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Profa. Dra. Mirna Bairy Leal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Rafael Moresco

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Bulcão, Rachel Picada

Avaliação toxicológica in vivo de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis / Rachel Picada Bulcão. -- 2013. 159 f.

Orientador: Solange Cristina Garcia.

Coorientador: Sílvia Stanisquaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanotoxicologia. 2. Toxicologia Experimental. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Guterres, Sílvia Stanisquaski, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dra. Solange Cristina Garcia e co-orientação da Prof^a. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres, nos laboratórios de Toxicologia da Faculdade de Farmácia e de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O trabalho também conta com a colaboração das professoras Dra. Adriana Raffin Pohlmann e Dra. Mirna Bainy Leal ambas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Grande do Sul, da Professora Dra. Eliane Dallegrove, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e dos Professores Dr. Carlos Thadeu Cerski do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Professor Dr. Paulo Zielinsky do Instituto de Cardiologia (FUC/IC). Rachel Picada Bulcão recebeu bolsa de doutorado da CAPES. Agradecimentos também ao CNPq, à FAPERGS (PRONEX - Projeto 10/0048-4) órgãos que financiaram o desenvolvimento deste trabalho, ao Instituto de Cardiologia (FUC/IC), aos Laboratórios de Toxicologia e de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.

Dedico este trabalho aos meus pais Jorge Luiz e Jussara.

E também aos meus irmãos Silvana e Fabrício.

Obrigada por serem essa família maravilhosa, por estarem sempre ao meu lado, por todo amor, carinho, compreensão, incentivo, renúncias,

e, sobretudo, pelo apoio incondicional aos meus sonhos.

Sem vocês não teria chegado até aqui.

Amo muito vocês!

*"Eu não tenho nenhum talento especial.
Apenas ser apaixonadamente curioso"*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde para alcançar meus objetivos.

À Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia por me dar a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e por sua contribuição a minha formação científica durante estes anos.

À Prof^a. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres pela co-orientação, pelo apoio, dedicação e ensinamentos.

À Prof^a. Dr. Eliane Dallegrave pela amizade, apoio, dedicação, incentivo, ensinamentos e por toda contribuição para realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr. Adriana Raffin Pohlmann, pelo apoio, dedicação e ensinamentos.

Ao Instituto de Cardiologia de Porto Alegre, especialmente ao Prof. Dr. Paulo Zielinsky e a equipe do biotério Grazi e Thiago.

À Prof^a. Dr. Mirna Bairy Leal por toda dedicação, disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Cerski, ao Prof Dr. José Cláudio Fonseca Moreira e a Prof^a. Dr. Mirian Salvador pela colaboração e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos queridos amigos e colegas do LATOX que permanecem e aos que passaram, mas marcaram e ajudaram de alguma forma: Amiguinha (Mariele), Ane, Angela, Bruna, Elisa, Fernanda W, Fernando, Gabi, Gilian, Guilherme, Marilia, Natália, Juliano, Rafael, Sabrina e Sarah

Aos queridos amigos do LABTOXICO, aos que permanecem e aos que passaram: Gabi, Rose, Elô, Tatá, Madinho, Adri, Rosana, Ana Laura, Maíra, Carol, Bruna, Vitória, André, Giuliano, Ana Paula

Agradeço a todos citados acima pelo apoio, incentivo, colaboração e aprendizado que me proporcionaram. Obrigada pelos momentos de descontração, amizade, carinho, conselhos, sorrisos, abraços e compreensão, por todos os cafés, discussões científicas, risadas e bons momentos vividos, que foram fundamentais em tantos momentos. Com certeza fiz amizades verdadeiras neste período que permanecerão para sempre.

Aos amigos e colegas do Laboratório 405 e K204, Cris, Karina, Ana, Karine, Rossana, Andressa, e aos demais pela dedicação, disponibilidade e apoio em tantos

momentos durante a execução do trabalho: vocês foram fundamentais e me receberam de braços abertos.

Aos amigos e colegas Fernando e Guilherme, meus braços direito e esquerdo neste trabalho, amigos de todas as horas, juntamente com a Eliane e a Mariele, obrigada pela amizade, pelos conselhos, debates, etc; à Cris, pela ajuda durante todo o doutorado, sendo na preparação, na caracterização das formulações quanto na redação dos manuscritos, à Karina Paese e à Ana Carolina, por toda a dedicação, ensinamentos, coleguismo, e pelas grandes amigas que se tornaram, à Scheila e a Karine que dedicaram um tempo para me mostrar como preparar as formulações. Ainda, ao Carlos (Bobs), à Rossana, ao Juliano, Gabriela G, Sabrina, Gilian, Marcelo, Érica, Gabriela Becker, Fernanda, que me ajudaram em várias etapas do trabalho, pela dedicação e companheirismo, sem a ajuda de vocês teria sido muito mais difícil.

A Karolina, minha grande amiga de tantas e todas as horas, obrigada pelo carinho, compreensão, pelo constante incentivo, apoio e paciência.

À Letícia, por ter me recebido de braços abertos, pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr Jan Hengstler, Silke, Esmina e Regina pela oportunidade, que mesmo breve, foi muito importante.

Aos grandes amigos do peito (a maioria já foi citada) e à turma de São Sepé, amigos há anos e que estão sempre por perto: obrigada pela amizade, carinho, apoio, incentivo, força, atenção, conselhos, paciência abraços, beijos, sorrisos, e compreensão das minhas ausências.

Aos meus novos colegas de trabalho, pela ajuda, incentivo e receptividade tornando minha adaptação mais fácil.

A toda minha família: pais, irmãos, cunhado, tios, tias, primos. Agradeço pelo apoio incondicional e pelo constante incentivo.

Aos professores Flávia Thiesen, Mirna Bainy Leal, Diogo Pilger e Rafael Moresco por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese. Aos professores que compuseram a banca de qualificação Tatiana Emanuelli e Ruy Beck, que contribuíram com este trabalho.

Ao Programa da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de realizar o doutorado.

A CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte de publicações, sendo organizada da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Capítulos 1, 2 e 3 (Manuscritos aceitos e em fase de redação), Discussão, Conclusões e Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexos.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico com uma breve revisão da literatura e a justificativa para o desenvolvimento do trabalho. Os **Materiais, Métodos e Resultados**, assim como as **Referências Bibliográficas** específicas encontram-se em cada **Manuscrito**, denominados **Capítulos 1, 2 e 3**.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos três manuscritos.

A seção **Conclusões e Perspectivas** aborda as conclusões gerais obtidas na tese e os próximos trabalhos a serem realizados.

A seção **Referências Bibliográficas** lista as referências utilizadas na Introdução e Discussão da tese.

A seção **Anexo** contém a aprovação do comitê de ética em pesquisa e o título dos trabalhos apresentados em congressos relacionados à tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. NANOTECNOLOGIA.....	24
1.1.1. Aspectos Gerais.....	24
1.2. NANOTOXICOLOGIA.....	30
1.2.1. Aspectos Gerais.....	30
1.2.2. Avaliação nanotoxicológica.....	33
1.2.3. Toxicidade de nanopartículas carreadoras de fármacos.....	36
1.2.4. Avaliação toxicológica in vivo e in vitro de NPs poliméricas.....	42
2. OBJETIVOS.....	47
2.1. OBJETIVO GERAL.....	48
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3. CAPÍTULO 1:.....	49
4. CAPÍTULO 2:.....	71
5. CAPÍTULO 3:.....	83
6. DISCUSSÃO GERAL.....	127
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	137
8. REFERÊNCIAS.....	141
9. ANEXOS.....	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de NPs utilizadas na pesquisa biomédica ou em <i>drug delivery</i>	25
Figura 2. Nanocápsula de núcleo lipídico.....	27
Figura 3. Método empregado na preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico...28	
Figura 4. Tipos de nanopartículas utilizadas na área biomédica	29
Figura 5. Relação das propriedades físico-químicas e as respostas <i>in vivo</i>	31
Figura 6. Vantagens e desvantagens das principais vias de administração de NPs	38
Figura 7. Possíveis mecanismos toxicológicos de NPs	40
Figura 8. Toxicidade nos diferentes sistemas biológicos.	41
Figura 9. Progressão dos estudos de avaliação toxicológica de nanopartículas.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AFSSAPS – *French Agency for the Safety of Health Products*
ALA-D – enzima Delta-aminolevulinato desidratase
AChE - acetilcolinesterase
BuChE - butirilcolinesterase
C3 – complement C3
CAT – Catalase
EO – estresse oxidativo
ER – espécies reativas
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
GSH – Glutathiona Reduzida
HaCat - células normais de queratinócito humano
id – via intradérmica
ip – via intraperitoneal
IPD – índice de polidispersão
LNC – nanocápsula de núcleo lipídico
MA – microalbuminúria
MDA – Malondialdeído
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MN – micronúcleo
MS – monoestearato de sorbitano
NAG – N-acetil- β -D-glicosaminidase
NC – nanocápsulas
NP (s) – nanopartícula (s)
OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development
PCL – poli(épsilon-caprolactona)
PCRus – proteína C reativa ultra sensível
PEG – polietilenoglicol
PGA – poli(ácido glicólico)
PGLA – poli(ácido glicólico-ácido lático)
PL - fosfolipídio
PLA – poli(ácido lático)
PS 80 – polissorbato 80
RLs – Radicais Livres
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCM – triglicerídeo de cadeia média

RESUMO

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis têm recebido atenção como carreadores de fármacos ao longo dos últimos anos. Em muitos casos, a segurança destes nanocarreadores não foi demonstrada e pouco se sabe sobre a relação entre as suas características físico-químicas e suas propriedades toxicocinéticas e toxicodinâmicas. A nanotoxicologia está emergindo como uma especialidade importante da nanotecnologia e/ou toxicologia, e refere-se ao estudo da interação de nanoestruturas com sistemas biológicos. Nos últimos anos, a maioria das pesquisas foi centrada em estudos *in vitro*, entretanto, os resultados destes estudos necessitam também ser avaliados em experimentos *in vivo* para o avanço na utilização de nanocarreadores na área biomédica. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), de poli(ϵ -caprolactona), após administração intraperitoneal (i.p.) e intradérmica (i.d.) em ratos Wistar. Para a avaliação toxicológica aguda, foi administrada dose única em que se observaram sinais clínicos e fisiológicos, em ambas as vias. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados e análises macroscópicas e histopatológicas foram realizadas. Além disso, sangue e urina foram coletados para análises laboratoriais e avaliação de funções teciduais. A avaliação toxicológica subcrônica foi procedida da mesma forma, exceto pela administração de doses repetidas diárias durante 28 dias. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de precipitação do polímero pré-formado, as quais apresentaram tamanho médio de partícula inferior a 250 nm, índice de polidispersão (IPD) < 1, potencial zeta negativo e pH em torno de 6,7. Os animais tratados pela via i.p. (n=6/grupo) receberam para avaliação da toxicidade aguda: solução salina ou polissorbato 80 (PS80) (12 ml/kg), utilizados como controles e diferentes doses de LNC (18,03, 36,06, e 72,12 $\times 10^{12}$ LNC/kg); no teste de toxicidade subcrônica foram utilizados os mesmos controles porém com doses de 3mL/kg e 6,01, 12,02 ou 18,03 $\times 10^{12}$ LNC/kg. Nos testes de toxicidade aguda, nos animais administrados pela via i.p., foi observada diminuição significativa de peso nos grupos tratados com LNC mesmo após 14 dias da administração (p<0,05). Entretanto no teste subcrônico esta alteração foi transitória, e ocorreu apenas no grupo que recebeu a maior dose até o quinto dia de administração (p<0,05). Houve aumento no peso relativo do baço nos animais que receberam a dose mais alta de LNC (p<0,05) no tratamento agudo. A análise histopatológica em ambos os tratamentos, demonstrou a presença de um granuloma de tipo corpo estranho no fígado e no baço dos animais que receberam a dose mais alta, provavelmente devido ao volume de LNC administrado. Não houve alteração nas análises bioquímicas de dano hepático, renal, dentre outros em todos os grupos tratados. Os dados hematológicos apresentaram uma leve alteração, entretanto foi demonstrada interferência metodológica, evidenciada por testes preliminares *in vitro*. Além disso, foram avaliados biomarcadores do estresse oxidativo (EO), marcadores inflamatórios e de genotoxicidade. Os resultados dos biomarcadores de oxidação de proteínas e lipídios não foram suficientes para iniciar um processo oxidativo, visto que não houve peroxidação lipídica. Ainda, não houve depleção de antioxidantes, dano ao DNA ou alteração nos marcadores inflamatórios. Nos ratos tratados pela via i.d., foi utilizada solução salina 1,2 ml/kg como grupo controle e uma dose de 7,2 $\times 10^{12}$ LNC/kg de LNC, para um estudo preliminar agudo e solução salina ou PS 80 (0,9ml/kg) e três doses de LNC (1,8, 3,6 ou 5,4 $\times 10^{12}$ LNC/kg) para avaliação da toxicidade subcrônica. No teste de toxicidade aguda, não houve alteração do peso corpóreo, entretanto no teste de toxicidade subcrônica houve uma diminuição

reversível do peso no grupo que recebeu PS80 ($p < 0,05$). Os dados histopatológicos não apresentaram alteração. Não houve alteração nos parâmetros bioquímicos, exceto uma leve diminuição da atividade da butirilcolinesterase no grupo que recebeu a dose mais alta ($p < 0,05$). Por outro lado, houve aumento nos leucócitos no grupo que recebeu LNC, no teste de toxicidade aguda e nos grupos que receberam PS 80 e $5,4 \times 10^{12}$ LNC/kg ($p < 0,05$) após doses repetidas. Em relação à avaliação sanguínea e tecidual dos biomarcadores do EO e dos marcadores inflamatórios, foi observada uma indução nos marcadores de oxidação de proteínas juntamente com uma indução enzimática nos ratos que receberam a dose mais alta, além de uma diminuição dos níveis do IL-10 nos grupos que receberam PS80 e a dose mais alta ($p < 0,05$). Pode-se concluir que nas condições dos experimentos, tanto pela via i.p. quanto pela via i.d., não foram demonstrados danos teciduais, pois os achados laboratoriais foram condizentes com os achados histopatológicos. Além disso, os mecanismos de reparo foram suficientes para contrabalançar eventuais danos oxidativos ou inflamatórios. Assim, o presente trabalho contribui para futuras avaliações toxicológicas de nanocápsulas poliméricas, visto que foram realizadas avaliações agudas e subcrônicas sistemáticas, com marcadores de dano renal precoce e possíveis mecanismos de toxicidade envolvidos após administração por ambas as vias. O aumento na utilização destas nanocápsulas e as lacunas nas informações toxicológicas fazem com que desafios importantes devam ser superados para permitir sua incorporação segura. Com isso, estudos nesta linha podem embasar a avaliação da resposta tóxica e, conseqüentemente, levar ao estabelecimento de regulamentações para avaliação da toxicidade da maioria das nanopartículas poliméricas biodegradáveis utilizadas como carreadoras de fármacos.

Palavras-chaves: nanotoxicologia, *in vivo*, poli(ϵ -caprolactona), nanocápsula de núcleo lipídico, intraperitoneal, intradérmica

ABSTRACT

Biodegradable polymeric nanoparticles have received attention as drug carriers over the past years. In many cases, the safety of nanocarriers has not been demonstrated and little is known about the relationship of its physicochemical characteristics and their toxicokinetic and toxicodynamic properties. Nanotoxicology is emerging as an important field of nanotechnology and toxicology, and refers to the study of the interaction of nanostructures with biological systems. In recent years, most research has focused on *in vitro* studies; however, the results of these studies should also be evaluated through *in vivo* experiments, in order to advance in biomedical application of nanocarriers. Thus, the objective of this study was to evaluate the toxicity of lipid-core nanocapsules (LNC), prepared with poly(ϵ -caprolactone), after intraperitoneal (i.p.) and intradermal (i.d.) administration in rats. For acute toxicological evaluation, it was administered a single dose, i.p. and i.d., clinical signs and physiological effects were observed. After 14 days, animals were euthanized and macroscopic and histopathological analyses were done. In addition, blood and urine were collected for laboratory analysis and evaluation of tissue functions. Subchronic toxicological evaluation was similar, except for the administration of repeated doses for 28 days. The suspension of nanocapsules were prepared by interfacial deposition of polymer, which had particle size less than 250 nm, polydispersity index (IPD) <1, negative zeta potential and pH around 6.7. Animals were treated via i.p. (N = 6/group), the doses used for acute toxicity test were: saline or polysorbate 80 (PS80) (12 ml/kg) as controls or three different doses of LNC (18.03, 36.06, e 72.12×10^{12} LNC/kg); for subchronic toxicity test, same controls were used but the doses were 3 ml/kg and 6.01, 12.02 ou 18.03×10^{12} LNC/kg administered daily for 28 days. In acute toxicity test, with i.p. administration, groups treated with LNC presented a significant reduction in relative weight even after 14 days of administration ($p < 0.05$); however in the subchronic test, this change was transient, and occurred only in the group receiving the highest dose until the fifth day of administration ($p < 0.05$). There was an increase in relative weight of spleen in animals that received the highest dose of LNC ($p < 0.05$) in acute treatment. Histopathological analysis in both the treatments, showed a granulomatous foreign body reaction in liver and spleen of animals receiving the highest dose, probably because the volume of LNC administered. There were no changes in biochemical parameters of liver or kidney damage, among all treated groups. Hematological data showed a slight change; however it was demonstrated an interference of the methodology, further evidenced by preliminary *in vitro* tests. Furthermore, we evaluated biomarkers of oxidative stress (OS), inflammatory and genotoxicity markers. The results of the oxidation of proteins and lipids biomarker were not sufficient to initiate an oxidative process, since no lipid peroxidation occurred. Still, no depletion of antioxidants, DNA damage or change in inflammatory markers was observed. In rats treated via i.d., saline was used as control (1.2 ml/kg) and a dose of 7.2×10^{12} LNC/kg of LNC to a preliminary acute study, and saline or PS 80 (0.9ml/kg) used as controls or three doses of LNC (1.8, 3.6 ou 5.4×10^{12} LNC/kg) for subchronic toxicity evaluation. In acute toxicity test, there was no change in relative body weight, however, a decreased was found for the group receiving PS 80 in subchronic test ($p < 0.05$). No histopathological alteration was found. Also, there was no change in biochemical parameters, except a slight decrease of butyrylcholinesterase activity in the group receiving the highest dose ($p < 0.05$). Moreover, in acute toxicity test, it was found an increase in white blood cells in group receiving LNC; these increasing also occurred after repeated

dose test, in PS 80 and 5.4×10^{12} LNC/kg of LNC groups ($p < 0.05$). Regarding blood and tissue biomarkers of OS and inflammatory markers, an induction in protein oxidation marker along with antioxidant induction in rats which received the highest dose were observed, also reduced levels of IL-10 in rats that received the higher dose and PS80 ($p < 0.05$). It can be concluded that, under the experimental conditions, for i.p. and i.d. administration, tissue damage was not found, since laboratorial analysis results were consistent with histopathological findings. Furthermore, mechanisms of repair were sufficient to offset oxidative damage or inflammation. Thus, this study contributes to future toxicological evaluations of polymeric nanocapsules, since a systematic acute and subchronic evaluation with early renal damage markers and possible mechanisms of toxicity involved after ip and id routes were performed. The increase in the use of these nanocapsules and the gaps in toxicological information make important to overcome these challenges in order to allow its safe incorporation. Thus, studies in this line are important to evaluate toxic response, and lead to establishing rules for evaluating the toxicity of most biodegradable polymer nanoparticles used as carrier of drugs.

Keywords: nanotoxicology, *in vivo*, poly(ϵ -caprolactone), lipid-core nanocapsule, intraperitoneal, intradermal

1.1 Nanotecnologia

1.1.1 Aspectos Gerais

A nanotecnologia, muitas vezes descrita como uma revolução tecnológica, combina alto investimento, rápido progresso científico e comercialização exponencialmente crescente, tendo assim um impacto significativo na sociedade nas últimas décadas (JAIN, 2005). As propriedades físico-químicas das nanopartículas (NPs) oferecem um potencial ilimitado de aplicações com benefícios que permitem melhorar a qualidade de vida e também ajudar no tratamento e na preservação do meio ambiente, visto que há uma enorme expansão da pesquisa nesse novo campo interdisciplinar que envolve biologia, física, química, engenharia, farmácia e medicina. Nesse sentido, pode-se mencionar o uso das NPs nas mais variadas áreas e produtos de consumo, como na fabricação de dispositivos eletrônicos, aditivos alimentares, produtos antibacterianos, engenharia de tecidos (LIU *et al.*, 2011), em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (MENARD, *et al.*, 2011), na medicina, no segmento de imagens em diagnósticos, também em pesquisas biológicas, como na detecção de biomoléculas em ensaios de DNA, imunoenaios e bioimagem celular (GARCIA, 2010; LIU, 2006), assim como sistemas carreadores de agentes terapêuticos que atuam na liberação de fármacos e genes (GUTERRES *et al.*, 2007; BRIGGER *et al.*, 2002, FARAJI e WIPF, 2009). Outra grande aplicação da nanotecnologia consiste nas novas formulações para o diagnóstico e tratamento do câncer, com o objetivo de aprimorar os métodos de detecção de tumores a aumentar a eficácia dos medicamentos utilizados atualmente (FERRARI, 2005).

Dentre os inúmeros materiais nanoestruturados com grande potencial na área biomédica, as NPs têm tido destaque como sistemas carreadores de fármacos (LEE e WANG, 2006), pois apresentam uma série de vantagens que as tornam promissoras no desenvolvimento de nanomedicamentos, sendo inúmeros os benefícios potenciais para aplicação clínica (GUTERRES *et al.*, 2007). Os sistemas carreadores nanoestruturados apresentam dimensões diferentes, e diferem entre si de acordo com a composição qualitativa e organização em nível molecular (COUVREUR *et al.*, 2002).

O emprego das NPs como sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery systems*) apresenta vantagens resultantes de duas das suas principais propriedades básicas: a) o tamanho reduzido, permitindo que penetrem através de pequenos capilares e que sejam capturadas por células, atravessando, portanto, certas barreiras biológicas, o que resulta em acúmulo no sítio alvo de ação; b) a versatilidade dos sistemas, nos quais diversos agentes terapêuticos podem ser encapsulados por diferentes mecanismos. Além disto, dependendo das condições de preparação (método e composição), sistemas com diferentes propriedades e características de liberação do fármaco podem ser desenvolvidos, inclusive permitindo sua cedência sustentada no sítio de ação, ou seja, as vantagens das aplicações destes sistemas vão desde a vetorização de fármacos a alvos específicos, após administração parenteral, até a veiculação de fármacos visando à administração oral, ocular ou tópica (GUTERRES *et al.*, 2007). São relatados ainda por diminuir a toxicidade, permitindo novas possibilidades para utilização dos fármacos. Comparados à terapia convencional, podem carrear o fármaco diretamente nas células doentes e minimizar os danos às células saudáveis (CHEN *et al.*, 2011). Como exemplos desses sistemas temos as nanopartículas poliméricas e os lipossomas, dentre outros (Figura 1) que estão sendo estudados para o tratamento de diversas doenças como câncer, inflamações e malária (KUMARI *et al.*, 2010).

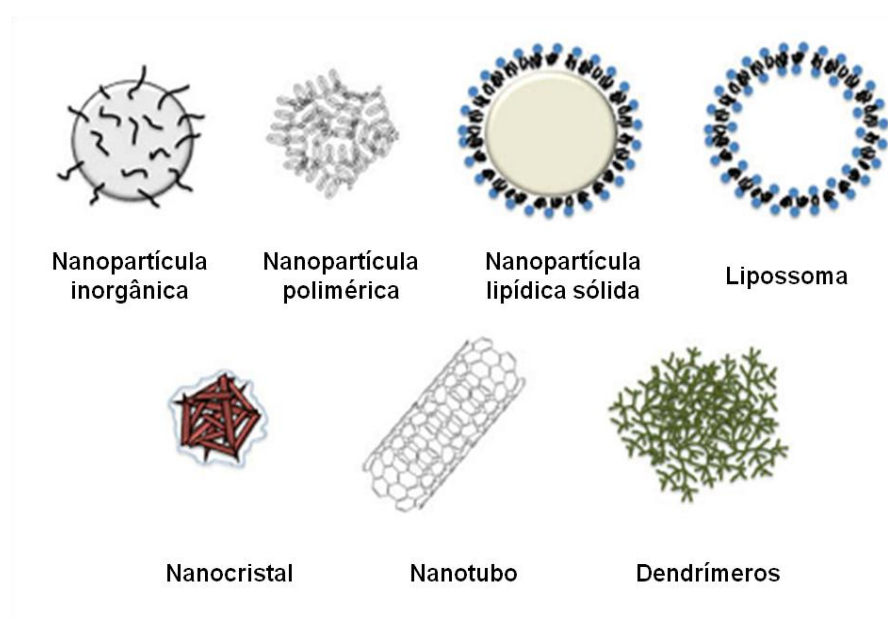


Figura 1. Diferentes tipos de nanopartículas utilizadas na pesquisa biomédica ou em *drug delivery* (Adaptado de FARAJI *et al.*, 2009)

NPs poliméricas são colóides vesiculares ou matriciais contendo polímero como um domínio no sistema, com diâmetro abaixo de 1 μm , o qual varia dependendo dos constituintes da formulação, bem como dos métodos de síntese. Geralmente possuem diâmetros médios compreendidos entre 100 e 500 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dentre as NPs poliméricas, encontram-se as nanocápsulas, que são vesículas carreadoras de fármacos formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo lipofílico; um novo tipo de nanocápsula, chamadas nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), que são vesículas estruturadas por uma dispersão de um lipídio sólido e um lipídio líquido envolvidos por uma parede polimérica (VENTURINI *et al.*, 2011), e as nanosferas as quais possuem uma matriz polimérica na qual o fármaco fica retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As aplicações das nanocápsulas poliméricas estão voltadas para polímeros biodegradáveis e biocompatíveis como ácido poli-D,L-lactídico-co-glicolídico (PLGA), ácido poliláctico (PLA), poli- ϵ -caprolactona (PCL), entre outros (KUMARI *et al.*, 2010). O termo biodegradável significa que os polímeros sofrem degradação macromolecular com dispersão *in vivo* (WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). A nanoescala biodegradável está sendo utilizada para obter um alto efeito com mínima toxicidade (GUTERRES *et al.*, 2007). Vários estudos têm relatado a utilização de LNC formadas com poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (Figura 2) com resultados promissores no âmbito de *drug delivery* (ALVES *et al.*, 2007, CATTANI *et al.*, 2010, CRUZ *et al.*, 2006, BERNARDI *et al.*, 2009, HAAS *et al.*, 2009, FROZZA *et al.*, 2010, BERNARDI *et al.*, 2012).

Para a obtenção dos efeitos terapêuticos desejados, os sistemas carreadores devem ser minuciosamente planejados em relação às suas características físico-químicas. As características físico-químicas das NPs, tais como hidrofobicidade, potencial de superfície, perfil de biodegradação, bem como as características do fármaco a ser associado, como solubilidade, massa molar, polaridade, etc, terão influência na organização em nível molecular dos sistemas, conseqüentemente influenciando o perfil farmacocinético/toxicocinético do fármaco (GUTERRES *et al.*, 2007; VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

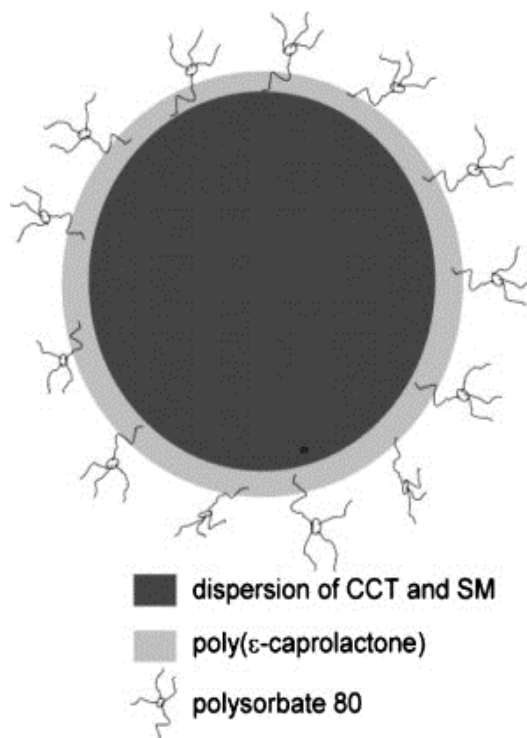


Figura 2. Nanocápsula de núcleo lipídico estruturada por uma dispersão de um lipídio sólido (monoestearato de sorbitano - SM) e um lipídio líquido (triglicerídio de cadeia média - CCT) envolvidos por uma parede polimérica (Adaptado de VENTURINI *et al.*, 2011)

Dentre os polímeros utilizados, a PCL tem recebido grande atenção para utilização em *drug delivery*, pois se destaca devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas. Além disso, é um polímero que apresenta degradação por hidrólise em condições fisiológicas, sendo mais lenta comparada a outros (GUTERRES *et al.*, 2007). Tem sido utilizada também para outras finalidades, como por exemplo, em dispositivos implantáveis utilizados a longo prazo (KUMARI *et al.*, 2010). Vários trabalhos têm demonstrado a importância do emprego deste polímero no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos nanoparticulados (SOPPIMATH *et al.*, 2001; LU e CHEN, 2004).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para preparação de NPs. Estes métodos podem ser classificados em duas principais categorias levando em consideração se a formação das NPs requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*), ou se estas são formadas diretamente com um polímero pré-formado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; JÄGER *et al.*, 2009). As LNC são formadas por precipitação do polímero pré-formado, como ilustrado na Figura 3.

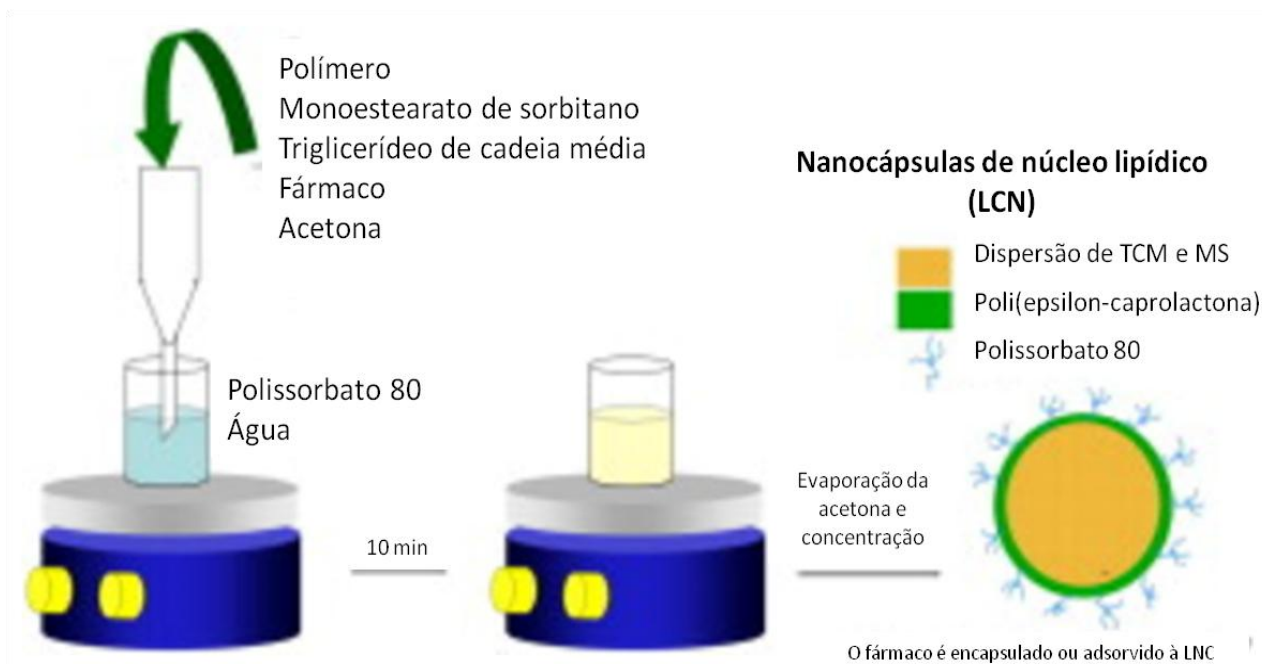


Figura 3. Método empregado na preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico, baseado na precipitação de polímeros pré-formados (Adaptado de VENTURINI *et al.*, 2011).

Existem diversos tipos de NPs, utilizadas na área biomédica, sendo estudadas quanto à sua toxicidade, dentre elas os nanotubos de carbono, dendrímeros, *quantum dots*, nanopartículas superparamagnéticas, dentre outras (Figura 4). Os dados disponíveis indicam que a toxicidade depende da composição dos nanomateriais e de suas propriedades, incluindo o tamanho das partículas, forma, superfície e solubilidade em fluidos biológicos, bem como a via de exposição (OBERDÖRSTER, 2005; KARLSSON, 2008; OSTIGUY, 2008; 2009; AITKEN, 2009), ou seja, dependendo do tipo de nanopartícula, as propriedades mudam e conseqüentemente sua toxicidade.

Ao mesmo tempo em que pesquisas na área de nanotecnologia avançam, existe uma limitada, porém crescente, quantidade de dados disponíveis sobre a toxicidade de nanomateriais (OSTIGUY, 2008). Entretanto, NPs poliméricas biodegradáveis utilizadas como sistemas carreadores de fármacos, não têm sido estudadas quanto a sua possível toxicidade e/ou possível mecanismo de toxicidade, devido ao fato de que na forma *bulk*, estes polímeros além de não apresentarem toxicidade, são ditos biodegradáveis; entretanto, sabe-se que alterando o tamanho das partículas, alteram-se as propriedades físico-químicas e sua interação com o organismo (YILDIRIMER *et al.*, 2011). Além disso, o fato de ser biodegradável não

significa que imediatamente após a degradação irá afastar-se do seu local de ação e ser removido do organismo (WOODRUFF e HUTMACHER, 2010).

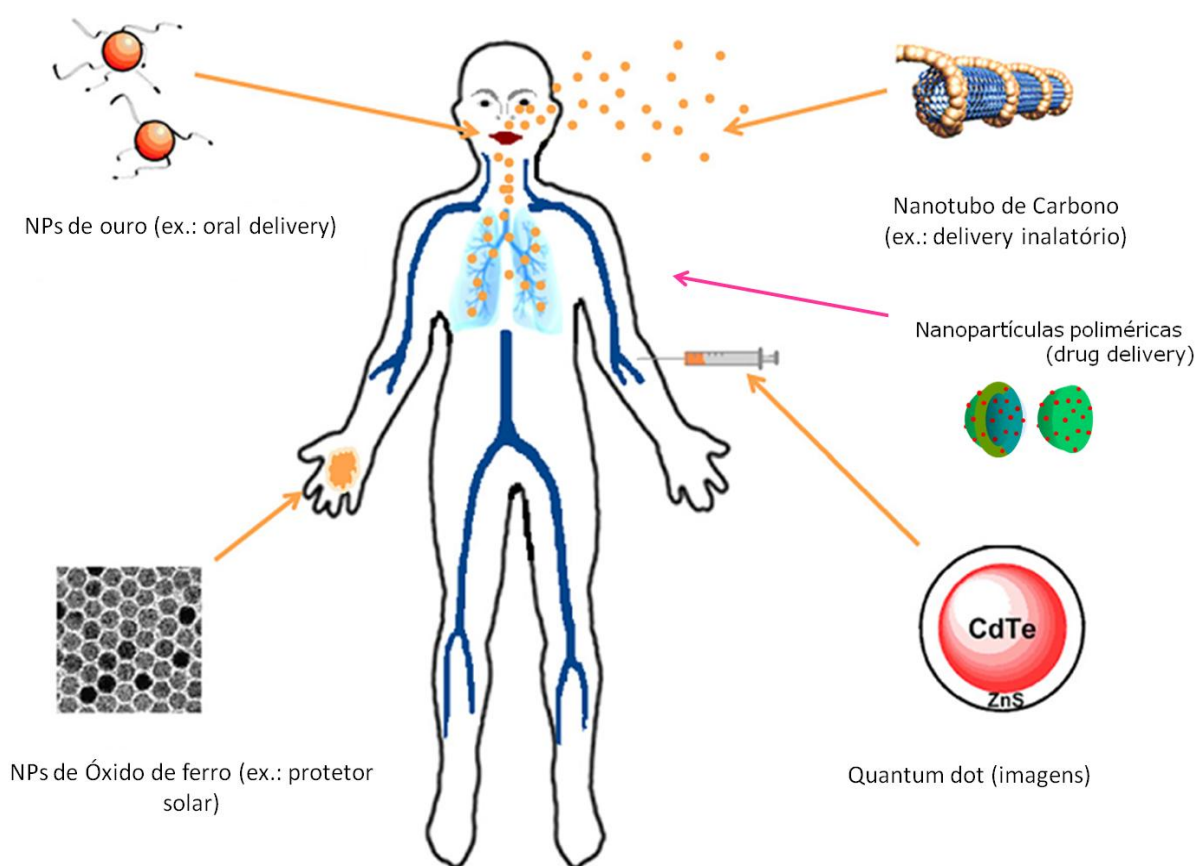


Figura 4. Tipos de nanopartículas utilizadas na área biomédica (Adaptado de YILDIRIMER *et al.*, 2011)

O estudo toxicológico de uma substância química é uma etapa importante para o uso seguro na saúde humana. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações sobre as concentrações de substâncias capazes de provocar efeitos tóxicos e identificar órgãos alvo suscetíveis a estes efeitos e conseqüentemente, a modificação desses produtos com o objetivo de melhorar a sua biocompatibilidade e minimizar seus efeitos tóxicos. A investigação sobre a segurança da nanotecnologia deve ser multidisciplinar e nesta linha, a nanotoxicologia é considerada uma subárea emergente e importante dentro desta ciência (OBERDÖSTER *et al.*, 2007).

Estudos da toxicidade de NPs biodegradáveis são importantes não só para avaliação dos materiais nanoestruturados, mas para garantir a segurança de formulações de alta tecnologia, preparadas com materiais biodegradáveis permitidos

pela legislação vigente para uso na forma *bulk* ou em solução, mas que ainda devem ser reavaliados quando nanoestruturados, principalmente quanto ao uso prolongado.

1.2 Nanotoxicologia

1.2.1 Aspectos Gerais

Há muitos anos é reconhecido que a forma física de materiais pode mediar sua toxicidade. Nos últimos 20 anos de pesquisas na área da toxicologia, foram sugeridas associações complexas e não reconhecidas entre as características físico-químicas de materiais em nanoescala e interações biológicas (MAYNARD *et al.*, 2011).

Além disso, com o rápido crescimento na área da nanotecnologia e a produção crescente de nanomateriais complexos, torna-se cada vez mais importante entender como a forma física e a composição química destes materiais interagem sinergicamente para determinação da sua toxicidade. Como resultado disso, a nanotoxicologia, considerada uma subárea emergente e importante dentro da toxicologia e da nanotecnologia, deve ser multidisciplinar, e estudos de possíveis induções nas respostas toxicológicas resultantes das interações entre as nanoestruturas e os sistemas biológicos precisam ser investigados (DONALDSON *et al.*, 2004, FISCHER e CHAN, 2007).

Outro aspecto importante é a nanotecnologia depender, em parte, da exploração das propriedades específicas que os nanomateriais possuem. Pelo fato de serem sintetizados à nanoescala, apresentam propriedades físico-químicas únicas que podem interferir e/ou reproduzir desafios no uso das avaliações toxicológicas clássicas. Estas propriedades físico-químicas únicas das NPs são também as que lhes conferem uma atividade biológica peculiar que, de certo modo, depende do seu tamanho. Essa diferente atividade biológica está relacionada a aspectos inerentes à sua capacidade de transpor as barreiras fisiológicas, à sua enorme reatividade química relacionada com a grande área superficial que apresentam em relação ao seu tamanho reduzido, etc (FARIA, 2010). Com isto, requerem uma maior caracterização de fatores como tamanho, forma, área de

superfície, solubilidade, aglomeração, pureza, que outros compostos químicos. Outras características como capacidade de adsorção, propriedades ópticas e aumento da atividade catalítica podem também influenciar os resultados de muitos estudos *in vitro* (DHAWAN e SHARMA, 2010). Portanto, a caracterização física e química das NPs representa um passo importante nos estudos toxicológicos e ecotoxicológicos (Figura 5), no sentido de avaliar corretamente os seus efeitos tóxicos, identificar as suas possíveis vias de exposição e prever os riscos relacionados com a sua síntese e utilização (MONTEIRO-RIVIERE, 2007)

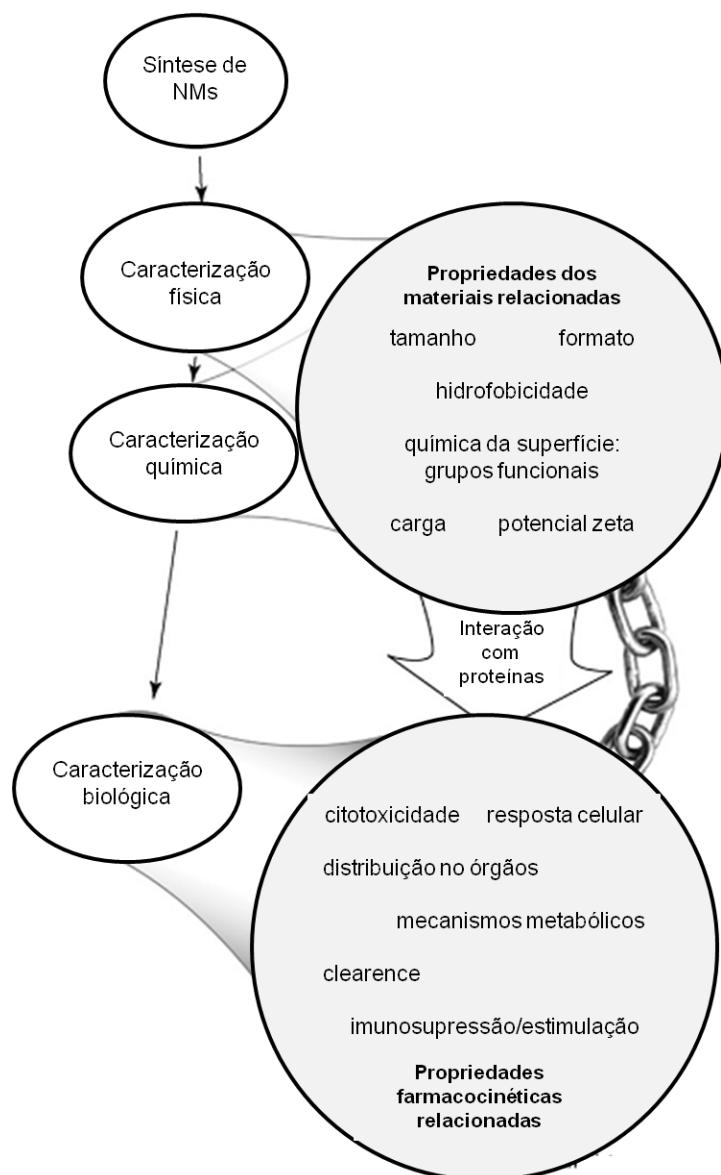


Figura 5. Relação das propriedades físico-químicas e as respostas *in vivo*. Cada propriedade da nanoestrutura pode influenciar na resposta biológica. Estudos devem caracterizar propriamente as nanoestruturas para correta interpretação dos resultados biológicos, visto que estão correlacionados. (Adaptado de FISCHER e CHAN, 2007)

OBERDÖRSTER e colaboradores (2005) deram os primeiros passos direcionados para a concepção de uma estratégia de avaliação toxicológica dos nanomateriais. Identificaram características das NPs que devem ser consideradas quando se pretende avaliar a sua toxicidade, tais como o seu tamanho, forma, área superficial, revestimentos, estrutura cristalina, entre outras. Contudo, as técnicas de avaliação das características físico-químicas das NPs não podem ser determinadas por técnicas utilizadas para a caracterização dos materiais de maior tamanho, nem com as técnicas de rotina aplicadas nos laboratórios (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005), dificultando assim, que haja uma caracterização detalhada de grande parte das nanoestruturas estudadas.

POWERS e colaboradores (2007) também abordaram a importância do entendimento prévio das características físico-químicas dos nanomateriais como parte essencial para se avaliar o potencial tóxico destes materiais em sistemas biológicos, incluindo medidas de tamanho e distribuição de tamanho, características morfológicas e químicas de superfície. Os autores sugerem regras fundamentais para o sucesso destes estudos, tais como: a) o emprego de amostras representativas; b) a medida do tamanho e distribuição de tamanho no estado mais disperso; c) a escolha da propriedade física mais adequada para cada tipo de caracterização; d) a análise do número de partículas; e) a caracterização das partículas, quando possível, nos meios biológicos, como por exemplo, nos meios utilizados nas culturas celulares ou no mínimo, em iguais condições de pH e força iônica (POWERS *et al.*, 2007).

Para o contínuo progresso da nanotecnologia é necessário o uso racional por meio da análise toxicológica dos materiais que estão sendo empregados. Isso conduz alguns países a publicarem inventários, disponíveis *online*, dos produtos consumidos com base em nanotecnologia, ressaltando dificuldades no reconhecimento (PEN, 2011). Além disso, o crescimento exponencial que a nanociência têm tido nos últimos anos, mobilizou a atenção do público, de entidades reguladoras e de toda a comunidade científica, para a necessidade de avaliar os riscos que os nanomateriais podem representar, tanto para o homem como para o ambiente, dado que a sua produção, quer à escala laboratorial quer à escala industrial, é cada vez maior. Nesta perspectiva, DONALDSON e colaboradores

(2004), propuseram este novo conceito na área da toxicologia, a ideia de que as NPs comportam-se de maneira diferente dos materiais da mesma composição química mas de maiores dimensões, sugerindo a criação desta nova área (DONALDSON *et al.*, 2004, MAYNARD *et al.*, 2011).

1.2.2 Avaliação nanotoxicológica

Atualmente, a maior parte das avaliações toxicológicas de NPs disponíveis na literatura científica está baseada em técnicas *in vitro*, demonstrando uma deficiência de avaliações toxicológicas *in vivo*, principalmente com exposição prolongada. Além disso, os poucos estudos *in vivo* não apresentam, em sua maior parte, diferentes vias de administração, comparação entre vias ou utilização de vias alternativas (OSTROWSKI *et al.*, 2009). Estes aspectos demonstram a necessidade de se conduzir estudos nessa área, fundamentais para fornecer subsídios para melhorar a aceitação pública dos produtos nanotecnológicos, permitindo ampliar a percepção pública da nanotecnologia. A importância do desenvolvimento e adaptação de métodos de avaliação da toxicidade de nanoproductos também está relacionada com o equacionamento dos aspectos regulatórios que propiciarão a aprovação de produtos seguros para o mercado.

A escassez de informações e regulamentações a respeito da avaliação toxicológica de nanomateriais expõe a necessidade de pesquisa nesta área. Alguns países têm adaptado protocolos estabelecidos, bem como realizado recomendações no âmbito da nanotoxicologia, entretanto existem divergências de informações e dificuldade em generalizar tais estudos devido à diferença entre os diversos nanomateriais avaliados. Além disso, existe prioridade em se avaliar materiais nanoestruturados, os quais, em sua forma *bulk*, apresentem toxicidade, como no caso dos nanotubos de carbono, óxidos metálicos, fulerenos, dentre outros (OECD, 2010). Entretanto, os materiais que já foram demonstrados seguros em medicamentos convencionais, deveriam ser mais estudados para sua rápida utilização como nanocarreadores. Além disso, materiais biodegradáveis são preferidos em relação a materiais bioresistentes, por possuírem melhor eliminação do corpo, evitando riscos de acumulação e toxicidade a longo prazo.

Para que um novo fármaco seja liberado para uso assistencial são exigidos inúmeros estudos toxicológicos que gerem as informações necessárias para comprovar a sua segurança e eficácia (ICH, 1996). Esta avaliação torna-se relevante quando novos biomateriais ou NPs são avaliadas. Neste contexto, a maioria dos estudos nanotoxicológicos tem como objetivo avaliar amplamente a toxicidade destes nanomateriais, através, principalmente, de estudos *in vivo* e *in vitro*, para que os compostos com maior probabilidade de sucesso em estudos pré-clínicos, devido à alta segurança, tolerância ou toxicidade reduzida, sejam identificados rapidamente.

A pesquisa com novos fármacos tem sido um dos grandes fatores motivadores para a regulamentação das atividades de pesquisa envolvendo seres humanos e animais. Estes estudos podem ser classificados em duas etapas: pré-clínica e clínica, sendo a primeira realizada em modelos celulares e animais e a segunda em seres humanos (GOLDIM, 2007). Estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações sobre as concentrações de substâncias capazes de provocar efeitos tóxicos e identificar órgãos alvo suscetíveis a estes efeitos, e complementarmente o mecanismo de ação envolvido. Com base nestes estudos é possível realizar modificações destes produtos com o objetivo de melhorar sua biocompatibilidade e minimizar seus efeitos tóxicos. Segundo LEHR *et al.* (2011), a partir das inúmeras possibilidades que o nanoencapsulamento de fármacos pode oferecer, é fundamental que se tenha a garantia da segurança destas formulações, que precisa ser demonstrada o quanto antes, especialmente por estudos pré-clínicos (*in vivo*), seguidos, finalmente, por estudos clínicos (LEHR *et al.*, 2011).

Testes de segurança pré-clínica devem considerar: (1) seleção de espécies animais relevantes, (2) idade, (3) estado fisiológico, (4) a forma de administração, incluindo a dose, a via de administração (preferencialmente mais de uma, ou a que será utilizada posteriormente), e o regime de tratamento, e (5) estabilidade do material de teste sob as condições de utilização. Além disso, a avaliação toxicológica pré-clínica de um novo fármaco pode ser subdividida em quatro estágios, de acordo com o tempo de exposição: toxicidade aguda, subaguda, subcrônica e crônica (KLAASSEN, 2001). A duração dos estudos pré-clínicos de cada composto deve estar relacionada ao período previsto para o seu uso terapêutico. Segundo a WHO (1993), os testes de toxicidade pré-clínica seguem

padrões comumente utilizados por diversos países, podendo variar de acordo com regulamentações individuais.

Um aspecto importante, principalmente nas fases pré-clínicas de desenvolvimento de nanofármacos, é a falta de orientação das agências reguladoras para que um conjunto de avaliações *in vivo* e *in vitro* seja realizado a fim de que os produtos progridam a partir de testes pré-clínicos para testes clínicos. Estudos *in vivo* avaliam o organismo como um todo, em que nanofármacos são carregados por um ou mais mecanismos dependendo da via de administração: inalatória, dérmica, ingestão ou injeção. Através de uma variedade de técnicas, avaliações *in vivo* incluem a determinação fisiológica da localização e da concentração do material em questão nos tecidos, taxa de excreção, avaliação macroscópica do tecido e toxicidade sistêmica em geral. Por outro lado, avaliações *in vitro* são compostas por estudos com células, tanto isoladas de animais quanto por linhagens celulares, em cultura de células. Em geral, o uso de células primárias (isoladas diretamente dos animais) proporcionam resultados mais realísticos da toxicidade, devido às linhagens celulares imortalizadas transformarem-se com o tempo; porém, o uso destas células é difundido, principalmente pela redução no uso de animais (MAURER-JONES E HAYNES, 2012). Existe uma abundância de testes *in vitro*, muitos deles permitem que os pesquisadores comprovem o mecanismo de interação das NPs com as células, além de serem testes rápidos, baratos e fáceis de serem executados pelo alto rendimento celular (MARQUIS *et al.*, 2009). No entanto, tanto testes *in vivo* quanto testes *in vitro* possuem limitações (custo e escolha da dose, respectivamente), porém ambos fornecem informações necessárias e complementares a respeito da ação de NPs terapêuticas formando diretrizes a serem informadas aos órgãos de fiscalização otimizando com isso, o progresso tecnológico. Enquanto o debate continua controverso sobre a necessidade de um novo regulamento ou de apenas uma regulamentação adicional aos existentes, torna-se necessário para a nanotecnologia que ocorra fiscalização, a qual irá fornecer orientações claras aos cientistas de qual direção seguir em estudos pré-clínicos e quais tipos de testes de toxicidade e modelos de sistemas permitirão um desenvolvimento rápido e seguro destes produtos (MAURER-JONES *et al.* 2009) e pesquisas nesta área fornecem subsídios para este progresso.

1.2.3 Toxicidade de nanopartículas carreadoras de fármacos

Nanopartículas carreadoras de fármacos podem ser sintetizadas a partir de uma ampla gama de precursores, incluindo materiais de carbono, polímeros, metais, dentre outros; podem ser compostos por um único elemento ou misturas de elementos e moléculas (OSTIGUY, 2007; AITKEN, 2009). Como citado anteriormente, tem sido alvo de interesse científico, pois possuem novas propriedades e características quando comparados às partículas de maiores dimensões com a mesma composição, incluindo maior área de superfície e maior reatividade química (STERN e MCNEIL, 2008).

No entanto, os nanocarreadores ditos “convencionais” (de superfície não modificada), que possuem superfícies mais ou menos hidrofóbicas, são reconhecidos como corpos estranhos. Consequentemente, têm como destino usual as células do sistema fagocitário mononuclear (células de Kupffer do fígado, macrófagos do baço, medula óssea, pulmão, nódulos linfáticos) por captura (“uptake”), após a opsonização (adsorção) por proteínas plasmáticas (opsoninas), sendo, portanto, rapidamente retirados da circulação. Para alterar este destino, modificações na superfície das estruturas devem ser feitas, gerando as chamadas nanopartículas furtivas (Stealth[®]) ou de longa circulação, as quais não sofrem opsonização e, por consequência, não são reconhecidas pelos macrófagos. Desta forma, as partículas carreadoras de fármacos podem circular na corrente sanguínea por um maior período de tempo, ao contrário dos sistemas convencionais, podendo acumular-se em outros alvos terapêuticos que não os macrófagos do sistema retículo endotelial, como por exemplo, em tumores sólidos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; GUTERRES *et al.*, 2007).

A toxicidade de NPs envolve sistemas fisiopatológicos, físico-químicos e moleculares. Um fator importante considerando a toxicidade de NPs é a via de administração, como citado anteriormente. Há exposição através de várias vias como inalatória, digestiva, dérmica, parenteral, dentre outras, resultando em diferentes barreiras biológicas que devem ser consideradas. A Figura 6 demonstra as vantagens e desvantagens de cada uma destas vias (YILDIRIMER *et al.*, 2011). Exposições através da pele, do trato respiratório, do trato gastrointestinal e dos vasos linfáticos têm sido descritos para NPs contendo metais, nanotubos de carbono,

dentre outras. Sabe-se que podem induzir citotoxicidade e/ou genotoxicidade. Por outro lado, sua antigenicidade ainda não está bem compreendida. Além disto, elas podem alterar as propriedades físico-químicas dos fármacos resultando em mudanças na estabilidade, solubilidade e disponibilidade farmacocinética (EL-ANSARY e AL-DAIHAN, 2009).

Após administração em animais, uma vez no corpo, NPs em geral, podem ser absorvidas, atravessar membranas e circular na corrente sanguínea e sistema linfático. Algumas translocam dos pulmões e do trato gastrointestinal para outros órgãos incluindo o cérebro, fígado e coração (OSTIGUY, 2008; STERN e MCNEIL, 2008). Dependendo da via de administração, podem também ser transportadas ao longo dos nervos por transporte axonal para estruturas ganglionares e para o sistema nervoso central (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005). Proteínas podem revestir a superfície das NPs alterando a maneira como interagem com as células, além de alterar a função das proteínas adsorvidas (EL-ANSARY e AL-DAIHAN, 2009). Em um estudo de revisão realizado por VEGA-VILLA e colaboradores (2008), em que pesquisaram a toxicidade de nanocarreadores orgânicos e inorgânicos, foi relatado que após administração intraperitoneal, NPs atravessaram a membrana transplacentária ou a cavidade peritoneal no útero, afetando o desenvolvimento craniano dos embriões e ocasionando a morte de alguns deles (VEGA-VILLA *et al.*, 2008). Além disto, foi relatado que após exposição oral, alguns tipos de NPs foram distribuídos pelo fígado, baço, pulmões, cérebro e trato gastrointestinal (GI) e ainda, cólon, medula óssea e vasos linfáticos após administração intravenosa (HAGENS *et al.*, 2007). A distribuição é seguida por uma rápida depuração sistêmica, predominantemente pela ação dos macrófagos, do fígado e do baço; no entanto, podem se acumular no fígado durante o metabolismo de primeira passagem (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005).

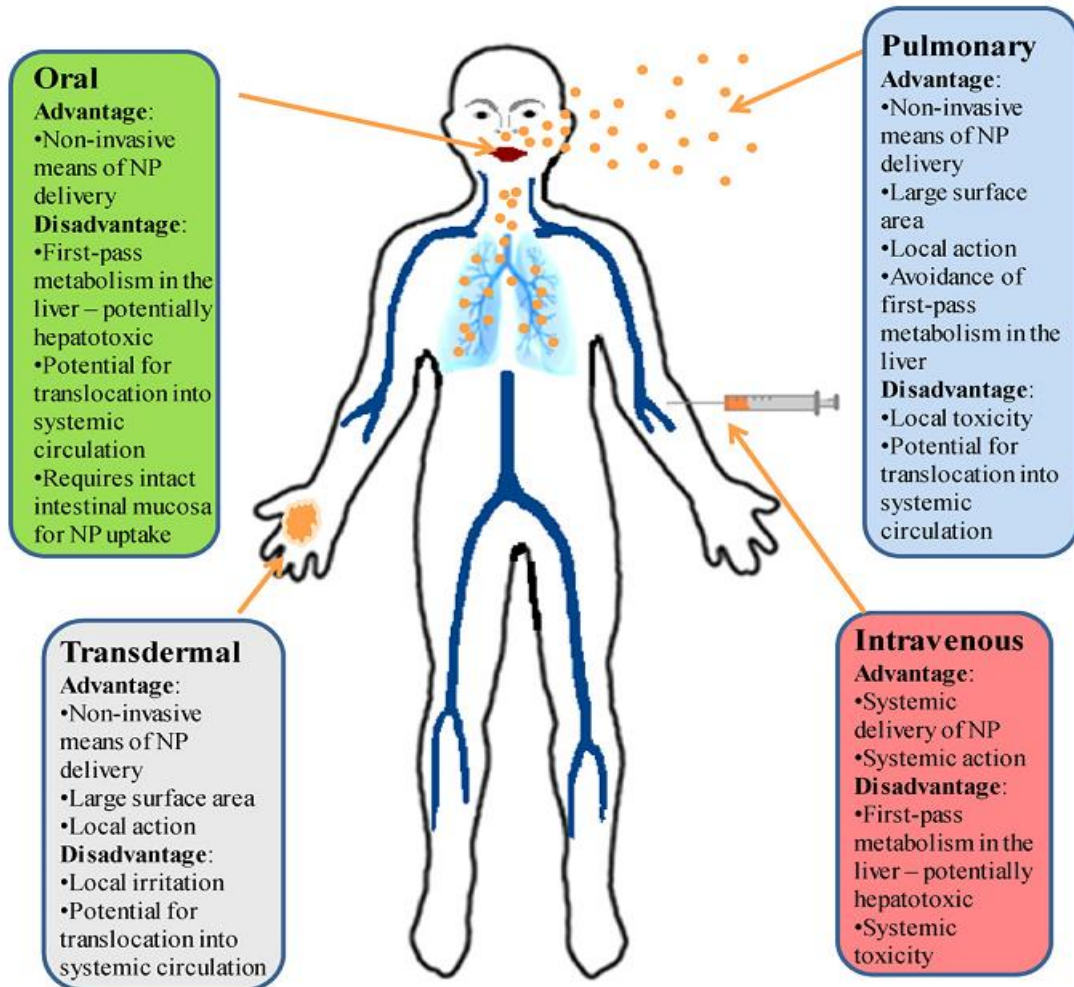


Figura 6. Vantagens e desvantagens das principais vias de administração de nanopartículas (YILDIRIMER *et al.*, 2011)

Segundo METCALFE e colaboradores (2008) uma vez que penetram nos tecidos ou são transportadas pelas membranas, a toxicidade das NPs de uma maneira geral, pode ocorrer por uma ou pela combinação de vários mecanismos. O comportamento das nanoestruturas pode ser resumido da seguinte forma: (1) nanoestruturas podem entrar no corpo através de seis vias: intravenosa, inalação, por via cutânea, subcutânea, intraperitoneal e oral (RAYMAN-RASMUSSEN *et al.*, 2007); (2) a absorção pode ocorrer quando houver interação com componentes biológicos (ou seja, proteínas, células); (3) logo, podem se distribuir para vários órgãos no corpo, podendo permanecer a mesma estrutura, ser modificada, ou biotransformada (BORM *et al.*, 2006); (4) podem entrar nas células dos órgãos, residir nas células por tempo indeterminado, para se deslocar para outros órgãos ou ser excretada (EL-ANSARY e AL-DAIHAN, 2009). Devido à escassez de estudos

envolvendo nanocápsulas ou até mesmo NPs poliméricas, a maioria dos estudos citados são com nanocarreadores diversos, como dendrímeros, lipossomas, nanoesferas, dentre outras NPs utilizadas como nanocarreadoras de fármacos.

Segundo DONALDSON e colaboradores (2004), NPs têm maior potencial para percorrer o organismo do que outros materiais ou partículas maiores. As diversas interações desses materiais com células, fluídos e tecidos devem ser considerados a partir do local de entrada e através de uma série de vias possíveis para órgãos-alvo. O potencial para resposta biológica significativa em cada um desses sítios exige investigação (DONALDSON *et al.*, 2004). Além disso, atividade biológica aumentada pode ser positiva ou desejável (por exemplo, atividade antioxidante, capacidade de transporte para fins terapêuticos, penetração na barreira hematoencefálica, na parede do estômago ou nos poros de um tumor, dispersos por todo o corpo incluindo a entrada no sistema nervoso central), ou efeitos indesejáveis e toxicidade (por exemplo, indução de estresse oxidativo, dano tecidual ou disfunção celular) ou uma mistura de ambas (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005).

Mecanismos identificados para a toxicidade dos nanomateriais incluem genotoxicidade, estresse oxidativo, processos inflamatórios, disfunção celular, dentre outros (AITKEN, 2009). Pesquisas têm demonstrado que diferentes nanomateriais podem danificar membranas por vários mecanismos (Figura 7) levando ao comprometimento da integridade e estabilidade da membrana (ELSAESSER e HOWARD, 2012).

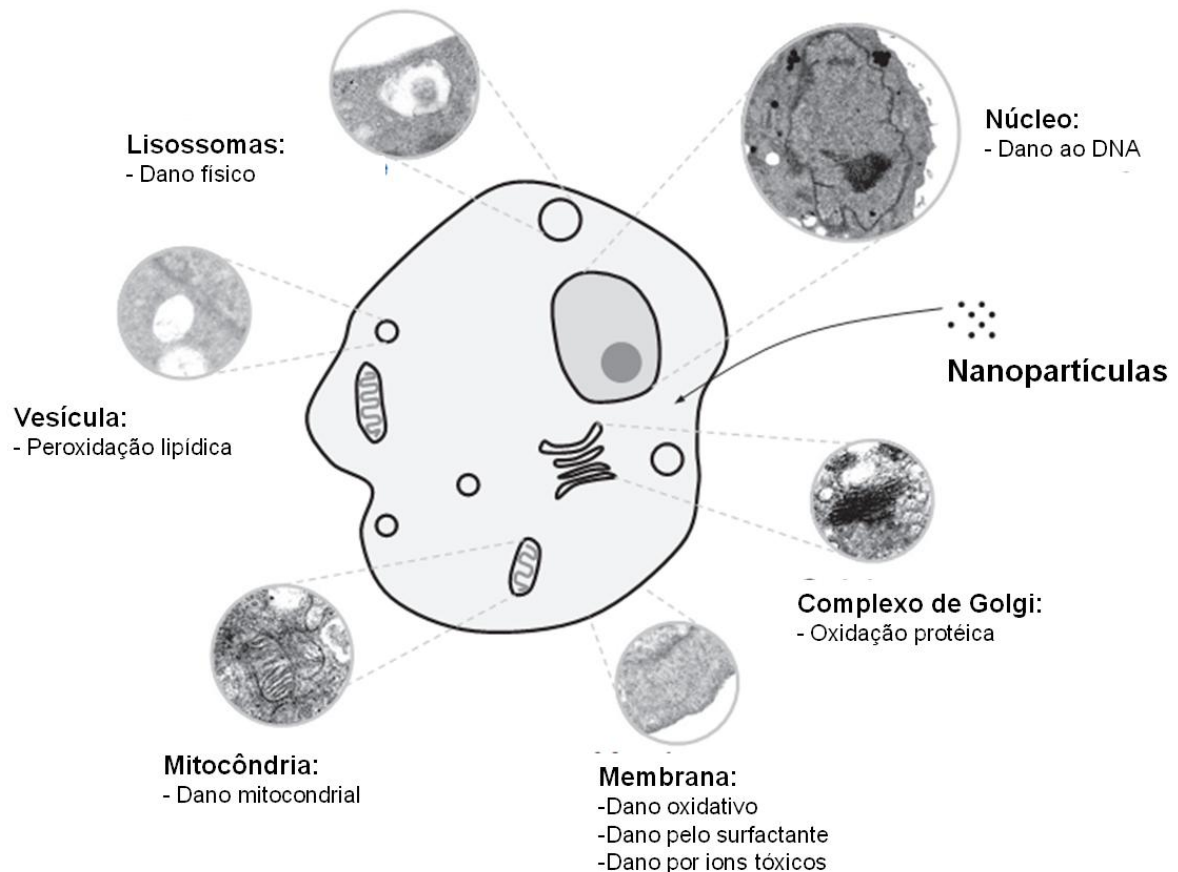


Figura 7. Possíveis mecanismos toxicológicos de nanopartículas (Adaptado de ELSAESSER e HOWARD, 2012)

A toxicodinâmica de muitos xenobióticos está relacionada com o aumento de dano oxidativo, devido ao aumento da formação de oxidantes e/ou a depleção de antioxidantes no organismo. Dentre os danos oxidativos pode ocorrer modificação de proteínas e/ou enzimas, com perda de função biológica, peroxidação lipídica, que aumenta a perda da integridade de membranas celulares e, ainda dano ao DNA, sendo que, em todas as situações, há como consequência danos teciduais (AMES *et al.*, 1993; SIES, 1995). A compreensão de possíveis mecanismos de toxicidade induzidos pelas NPs depende de diversos fatores, dentre eles a via de exposição, a dose, e as propriedades físico-químicas destas nanoestruturas. Como citado anteriormente, estas particularidades irão interferir diretamente no seu comportamento *in vivo*, e na sua relação com o sistema biológico (DONALDSON *et al.*, 2009). Evidências de alteração mitocondrial e oxidativa após endocitose das nanopartículas foram relatadas, e sugeriu-se ser devido ao pequeno tamanho destas partículas, podendo agir como haptenos para modificar as estruturas de proteínas,

quer alterando sua função, quer tornando-as antigênicas, e assim elevar seu potencial para efeitos autoimunes (KLIMUK *et al.*, 2000).

O dano oxidativo causado pelos radicais livres gerados pela interação das partículas com células pode resultar em morte celular. Nanomateriais podem atuar induzindo resposta inflamatória, e/ou acarretar estresse oxidativo, como por exemplo, por depleção de sistemas de defesa antioxidante como superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona reduzida, tioredoxinas, metalotioneínas, entre outros (BHATT e TRIPATHI, 2011). Entretanto estudos dos possíveis mecanismos de toxicidade de nanopartículas poliméricas biodegradáveis são escassos. A Figura 8 demonstra algumas alterações resultantes da exposição a nanopartículas utilizadas na terapêutica. Além disso, existem poucos estudos a respeito da genotoxicidade destas nanopartículas. DONALDSON e colaboradores (2009) relataram o potencial genotóxico de nanotubos de carbono, além de doenças autoimunes relacionadas com a exposição a nanomateriais (DONALDSON *et al.*, 2009).

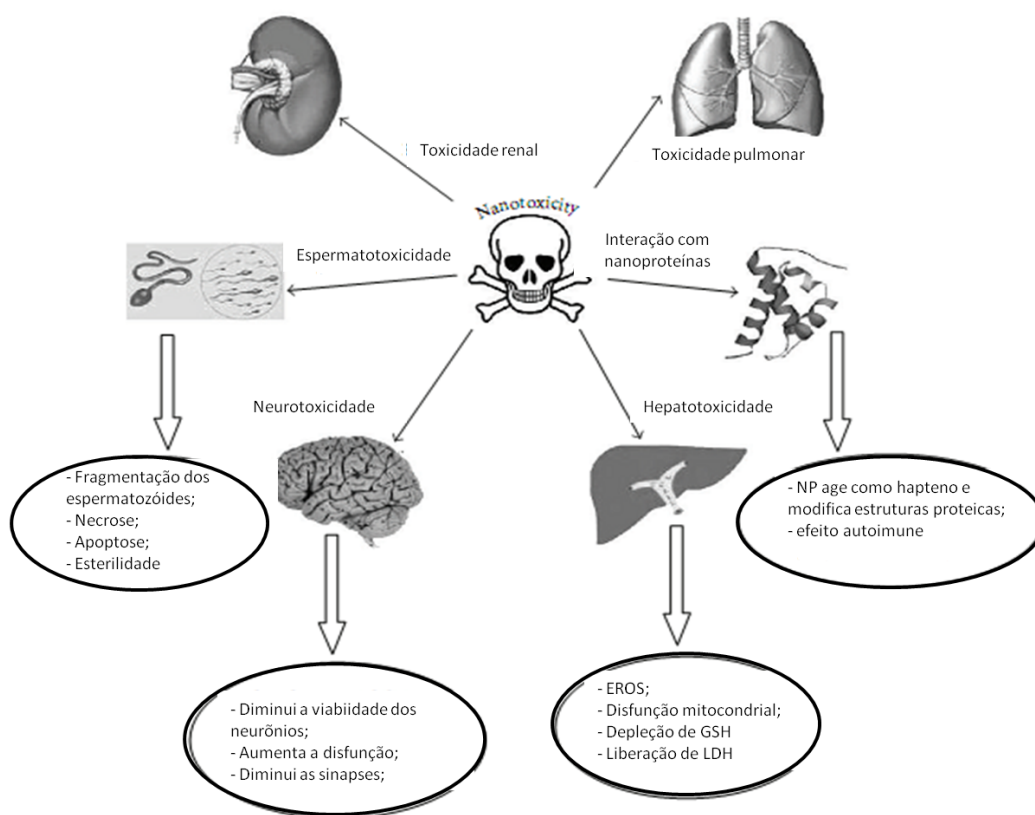


Figura 8. Toxicidade nos diferentes sistemas biológicos. Adaptado de EL-ANSARY e AL-DAIHAN, 2009. (NP: nanopartículas; ROS: espécies reativas de oxigênio; GSH: glutatona reduzida; LDH: lactato desidrogenase)

1.2.4 Avaliação toxicológica *in vivo* e *in vitro* de NPs poliméricas

Na maioria das vezes, em estudos de avaliação toxicológica, são realizados estudos *in vitro* de citotoxicidade e genotoxicidade, funcionando como um *screening* para as análises *in vivo* (STONE *et al.*, 2009). Entretanto, existem relatos da importância de estudos *in vivo* previamente a estudos *in vitro*, em se tratando de análises nanotoxicológicas, isto se deve, em parte, a interferências metodológicas encontradas em testes *in vitro*, bem como a ausência de correlação entre estudos *in vitro/in vivo*.

Recentes revisões têm focado nos desafios, questionamentos e pesquisas necessárias para avaliar a toxicidade de nanomateriais (YOKEL e MACPHAIL, 2011; DHAWAN e SHARMA, 2010). A comparação entre os resultados de estudos *in vitro* com os correspondentes testes *in vivo* é importante para estabelecer a melhor correlação entre as informações toxicológicas (FISCHER e CHAN, 2007). Porém, em análises nanotoxicológicas, uma vez que órgãos e células específicas são identificados, estudos complementares *in vitro* são realizados. Atualmente, a maioria dos estudos nesta área utilizam modelos de culturas de células, em que os resultados podem ser considerados apenas como exploratórios, visto que o comportamento *in vivo* muitas vezes é diferente. Devido a isso, estudos *in vitro* de toxicidade de nanopartículas devem ser complementares aos estudos *in vivo*, como ilustrado na Figura 9 (FISCHER e CHAN, 2007).

As análises *in vivo* são compostas por testes toxicológicos agudos, subcrônicos e crônicos, em modelos animais, avaliando a histopatologia bem como as respostas toxicológicas teciduais como imunogenicidade, carcinogenicidade, e respostas inflamatórias. Para proceder a essas análises é importante seguir protocolos, com critérios previamente estabelecidos, o que nem sempre é observado. A *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), por exemplo, é uma instituição que comumente estabelece e valida os estudos de toxicidade.

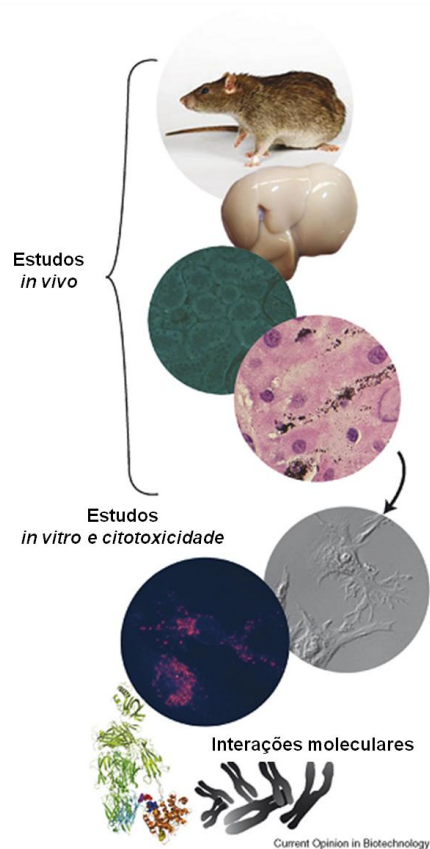


Figura 9. Progressão de estudos de avaliação toxicológica de nanopartículas. Após órgãos-alvo serem identificados em estudos *in vivo*, estudos *in vitro* podem ser conduzidos (Adaptado de FISCHER e CHAN, 2007)

Na escala nano há poucas avaliações sobre a toxicidade *in vivo* de nanopartículas poliméricas biodegradáveis e geralmente, são estudos com associação a um fármaco e não da nanocápsula, ou da formulação em si. HUANG e colaboradores (2010) verificaram a toxicidade aguda e a genotoxicidade de nanopartículas de um copolímero de poli- ϵ -caprolactona–polietilenoglicol-poli- ϵ -caprolactona, com aproximadamente 40 nm, após múltiplas administrações pela via intravenosa em ratos, até atingir uma concentração de 2.4g/kg. Nos testes de toxicidade aguda não foram observadas alterações patológicas em diversos órgãos, não ocorreram efeitos adversos, efeitos mutagênicos ou aberrações cromossômicas. Entretanto, mais estudos que demonstrem os limiares de toxicidade desses materiais são necessários. Nanopartículas de PLGA e copolímeros de monometóxi(polietilenoglicol)-PLGA também foram estudados por HE e colaboradores (2009), os quais relataram que mesmo em altas concentrações, o PLGA e o copolímero não causaram severidade grave em células ovarianas de

hamsters Chineses. O PLGA é hidrolisado em meio ácido produzindo monômeros biodegradáveis como lactato e ácido glicólico, esses produtos são metabolizados no ciclo do ácido cítrico. Foi relatada a citotoxicidade de nanoesferas e microesferas de PLA em relação à endocitose de partículas, com diferentes teores de polietilenoglicol utilizando osteoblastos de ratos, as quais não causaram citotoxicidade. Além disso, as células apresentavam morfologia normal. No grupo das microesferas foi demonstrado que o tamanho pode influenciar na formação de agregados que dificultam a absorção (WANG *et al.*, 2010).

Além disso, a nanopartícula em si pode não produzir toxicidade, porém deve-se ter cuidado ao avaliar a formulação que está sendo utilizada. Tensoativos de alta hidrofilia são empregados para evitar a aglomeração como laurilsulfato de sódio (aniônico), sais de amônio quaternário (catiônicos) ou, mais frequentemente polissorbatos (PS80; PS20) e poloxamers (GUTERRES *et al.*, 2007). Liu e colaboradores (2010) testaram nanopartículas de PLA-PEG sem PS80 *in vitro* observando diminuição da toxicidade, que por causa da baixa solubilidade em água utilizava altas concentrações do estabilizante. MAUPAS e colaboradores (2011), avaliaram a citotoxicidade de nanocápsulas lipídicas (NC), utilizadas como *skin drug delivery*, as quais foram tensoativas-dependentes em células HaCaT. Foram utilizados tensoativos não-iônicos, incluindo o PS80, e a toxicidade *in vitro* das NC foi tensoativo-dependente. Eles concluíram que as NC foram adequadas como transportador para *delivery* cutâneo no entanto, a toxicidade pode variar dependendo do tensoativo utilizado para a preparação (MAUPAS *et al.*, 2011).

Em geral, os polímeros biorreabsorvíveis são bem tolerados pelos tecidos vivos. A PCL apresenta degradação mais lenta que os ácidos polilácticos, são hidrolisadas a 6-hidroxil-capróico que também é metabolizado no ciclo (KUMARI *et al.*, 2010). Se o órgão envolvido na eliminação dos subprodutos tiver capacidade baixa de eliminação, pode ocorrer distúrbios locais temporários como acidificação. Os ácidos biorreabsorvíveis podem, então, contribuir para um desencadeamento de respostas inflamatórias. Em altas doses e na forma *bulk*, microsferas de PCL de 100 a 500µm injetadas em ratos Wistar resultaram na ativação de neutrófilos. Esta ativação fez com que ocorresse a liberação de quimioestáticos aumentando o número de neutrófilos e levando a inflamação. A fagocitose das microesferas poliméricas por células sanguíneas foi o principal mecanismo de depuração (WOODRUFF e

HUTMACHER, 2010). Entretanto estudos com nanoesferas ou nanopartículas são escassos.

No presente estudo, foi avaliada a toxicidade *in vivo* de nanocápsulas de núcleo lipídico, cujo polímero é a poli(ϵ -caprolactona). Além de existirem poucos estudos relacionados à toxicidade de NPs poliméricas biodegradáveis, a maioria trata-se de estudos *in vitro* cujos resultados não podem ser considerados totalmente fidedignos devido às diferenças entre o comportamento destas NPs *in vitro* e *in vivo*; ainda, em sua maioria, são estudos utilizando outros polímeros biodegradáveis, como citado anteriormente; e a via de administração, na maioria das vezes, é a inalatória (VALLE *et al.*, 2008; YOKSAN e CHIRACHANCHAI, 2008). A importância em se estudar a toxicidade destes sistemas carreadores de fármacos é devido a resultados promissores no âmbito de *drug delivery*, utilizando estas LNC formadas com poli (ϵ -caprolactona) e estabilizadas por polissorbato 80 (PS80), demonstrando um grande avanço na obtenção de nanoformulações no combate de glioblastomas contendo anti-inflamatórios (BERNARDI *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009), encapsulando antiparasitários visando o tratamento da malária (HAAS *et al.*, 2009), e antioxidantes como o resveratrol (FROZZA *et al.*, 2010), dentre outros.

Além disso, existe uma necessidade urgente de desenvolver metodologias que possam determinar a toxicidade de forma rápida, precisa e eficiente, com o intuito de avaliar e compreender o potencial efeito tóxico destes materiais emergentes (HU *et al.*, 2009). Ainda, para desenvolver ensaios que permitam avaliar a toxicidade das NPs é importante padronizar estas metodologias, caracterizar devidamente as NPs do ponto de vista físico-químico e avaliar quais destas características são mais determinantes para a sua toxicidade. É também imprescindível desenhar testes novos ou adaptar os testes já existentes, no sentido de minimizar os erros cometidos na avaliação da toxicidade dos nanomateriais (MARQUIS *et al.*, 2009).

Em vista disto, o objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis efeitos tóxicos das formulações de LCN, após exposições aguda e subcrônica pelas vias intraperitoneal e intradérmica, em modelo animal. Estudos toxicológicos pré-clínicos e o estabelecimento de protocolos e recomendações para avaliar a toxicidade de nanomateriais poliméricos biodegradáveis são fundamentais para a sua futura utilização em humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos toxicológicos sistêmicos após exposições aguda e subcrônica a nanocápsulas de núcleo lipídico pelas vias intraperitoneal e intradérmica em ratos

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar possível hepatotoxicidade, através de marcadores de dano hepático, após exposições agudas e subcrônicas a estas LNC, por ambas as vias de administração;
- Avaliar possível nefrotoxicidade, através de quantificações de marcadores de dano renal precoce, após exposições agudas e subcrônicas a estas LNC, por ambas as vias de administração;
- Avaliar alterações hematológicas após exposições agudas e subcrônicas a estas LNC, por ambas as vias de administração;
- Quantificar outros parâmetros laboratoriais para complementar a avaliação da toxicidade sistêmica após administração de LNC;
- Investigar possíveis mecanismos que possam ser induzidos pela administração subcrônica destas LNC através da quantificação de biomarcadores do estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e ensaio cometa (potencial genotóxico).

3. CAPÍTULO 1

“Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Lipid-Core Nanocapsules in Intraperitoneously Exposed Rats”

Artigo publicado na revista *Toxicological Sciences* doi: 10.1093/toxsci/kfs334

ACUTE AND SUBCHRONIC TOXICITY EVALUATION OF POLY(EPSILON-CAPROLACTONE) LIPID-CORE NANOCAPSULES IN RATS

*Rachel P. Bulcão, Fernando A. de Freitas, Cristina G. Venturini, Eliane Dallegrave, Juliano Durgante, Gabriela Göethel, Carlos Thadeu S. Cerski, Paulo Zielinsky, Adriana R. Pohlmann, Sílvia S. Guterres, Solange C. Garcia**

METHODS

Dynamic light scattering and electrophoretic mobility

The nanoparticles in solution undergo Brownian motion, and the velocity of this Brownian motion is the translational diffusion coefficient (D_t). D_t is converted into particle size using the Stokes-Einstein equation (Eq.(2))

$$D_z = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t} \quad (2)$$

where D_z is the hydrodynamic diameter, D_t is the translational diffusion coefficient, k_B is the Boltzmann's constant, T is the temperature, and η is the viscosity. The hydrodynamic diameter is the intensity weighted mean particle size.

The z -average diameter is determined by fitting the correlation function using the cumulant method. The polydispersity index (PdI) is the relative variance in the particle size distribution (Eq.(3)) – the more the particles monodisperse, the lower is the PdI

$$PdI = \frac{\sigma^2}{Z_D^2} \quad (3)$$

where σ is the standard deviation of the hypothetical Gaussian distribution and Z_D is the z -average diameter, which is the intensity weighted mean hydrodynamic size fitting the experimental correlation function using the cumulants method.

Biochemical parameters in blood and urine

Blood was drawn for biochemical analysis (heparin collection tube) using blood (vena cava) collection technique for hepatic function, analyzing alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), albumin (ALB), and lactate dehydrogenase (LDH). For kidney function, uric acid (UA), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), and urinary creatinine (Cr-U) were determined. Also, total cholesterol (TCHO), triacylglyceride (TAG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and glucose (GLU) were assessed for lipid profile and blood sugar using a biochemical auto analyzer (Labmax 240® Labtest Diagnóstica SA, Brazil). Butyrylcholinesterase activity (BuChE) in serum was determined by Doles® (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil) commercial kits using a spectrophotometer (Biospectro SP-220).

For urine collection, the rats were housed in metabolic cages for 12 h for different number of days for each toxicity study. For the acute toxicity test, the samples were collected before treatment (Day 0), 24 h after treatment (Day 1), on the 7th day (Day 7), and on the 14th day after treatment (Day 14). For the subchronic toxicity study, the urine samples were collected on Day 0, 1, 15, and 28. Urine pH and specific gravity were analyzed using urine dipstick (Multistix 10 SG Siemens, Bayer).

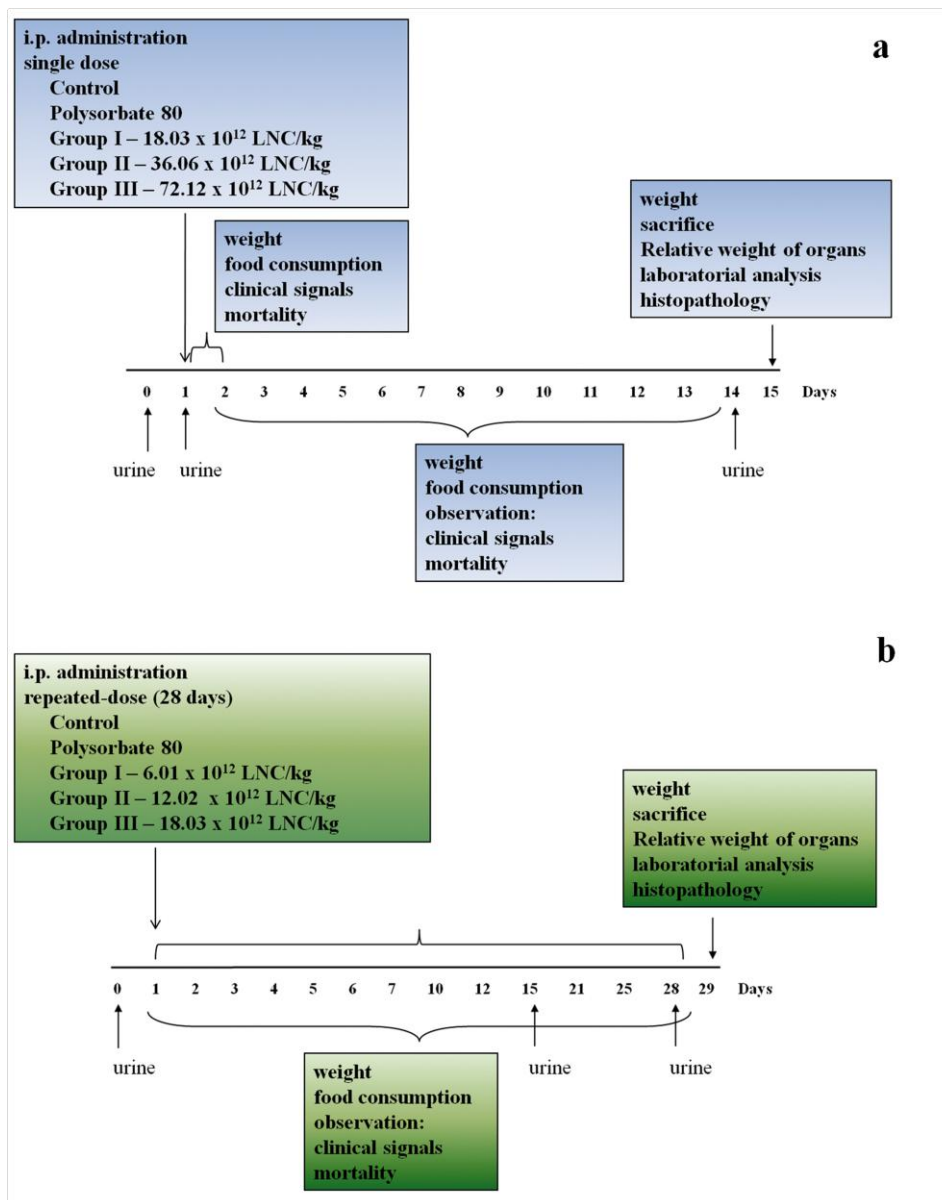


Figure S9. Experimental design of acute toxicity evaluation with single administration and euthanized after 14 days (a) and subchronic toxicity evaluation with repeated administration and euthanized after 28 day (b). In both experiments, rats had 2 weeks of adaptive period. Acute treatment: Control – saline solution (12 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (12 mL/kg). Subchronic treatment: Control – saline solution (3 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (3 mL/kg).

Table S4. Relative weight of organs in acute toxicity evaluation

Group	N	Weight (g)	Liver (%)	Right Kidney (%)	Left Kidney (%)	Cardiac muscle (%)	Brain (%)	Spleen (%)	Lung (%)
Control	9	335 ± 54	3.95 ± 0.2	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.58 ± 0.07	0.26 ± 0.02	0.40 ± 0.05
PS80	9	351 ± 31	4.01 ± 0.4	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.52 ± 0.10	0.26 ± 0.03	0.42 ± 0.08
Group I	6	343 ± 27	3.97 ± 0.4	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.41 ± 0.05
Group II	6	338 ± 36	4.01 ± 0.2	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.58 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.43 ± 0.07
Group III	6	358 ± 29	3.80 ± 0.2	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.26 ± 0.02	0.42 ± 0.04

Values are expressed as mean ± standard deviation. Data were analyzed by ANOVA.

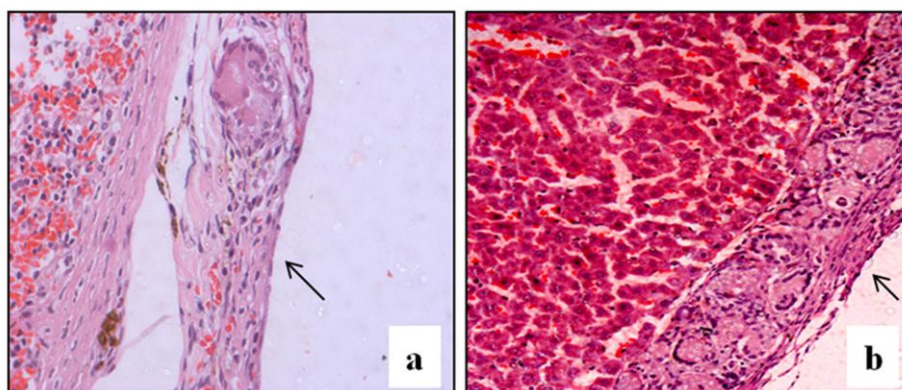


Figure S10. Representative photomicrographs using H & E staining of: spleen of Group III (a – 400×); liver of Group III (b – 400×) in acute treatment ($n = 4$). Black arrows indicate a granulomatous foreign body reaction.

Table S5. Blood hepatic markers in acute and subchronic treatments ($n= 6$).

	Control	PS80	Group I	Group II	Group III
Acute					
AST (U/l)	95 ± 48	78 ± 17	82 ± 9	107 ± 47	85 ± 15
ALT (U/l)	37 ± 8.2	51 ± 19	41 ± 10	48 ± 25	39 ± 15
ALP (U/l)	178 ± 60	183 ± 46	222 ± 70	219 ± 72	209 ± 85
LDH (U/l)	365 ± 76	312 ± 99	349 ± 104	339 ± 87	307 ± 59
ALB (g/dl)	2.77 ± 0.22	2.86 ± 0.16	2.98 ± 0.23	2.96 ± 0.34	2.78 ± 0.31
TP (mg/dl)	6.32 ± 0.47	6.45 ± 0.29	6.37 ± 0.35	6.47 ± 0.36	6.25 ± 0.49
Subchronic					
AST (U/l)	92 ± 9	87 ± 17	88 ± 8	89 ± 7	91 ± 15
ALT (U/l)	46 ± 6	36 ± 17	39 ± 8	42 ± 10	42 ± 8
ALP (U/l)	172 ± 12	215 ± 65	185 ± 18	164 ± 23	185 ± 36
LDH (U/l)	348 ± 23	280 ± 78	347 ± 92	364 ± 67	378 ± 89
ALB (g/dl)	2.83 ± 0.14	2.94 ± 0.19	2.60 ± 0.33	2.73 ± 0.33	2.81 ± 0.21
TP (mg/dl)	6.04 ± 0.63	6.33 ± 0.32	5.73 ± 0.33	5.87 ± 0.60	6.09 ± 0.34

AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; LDH: lactate dehydrogenase; ALB: albumin; TP: total protein. Acute treatment: Control – saline solution (12 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (12 mL/kg); Group I – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (36.06×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (72.12×10^{12} LNC/kg) single dose by ip. Subchronic treatment: Control – saline solution (3 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (3 mL/kg); Group I – LNC (6.01×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (12.02×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg) for 28 days by ip. Data were analyzed by ANOVA. Values are expressed as mean ± standard deviation.

Table S6. Blood kidney markers in acute and subchronic treatments (n= 6).

	Control	PS80	Group I	Group II	Group III
Acute					
BUN (mg/dl)	18.06 ± 4.2	18.00 ± 2.75	19.06 ± 3.41	19.38 ± 1.98	17.60 ± 2.28
Cr (mg/dl)	0.28 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.06	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.04
UA (mg/dl)	0.14 ± 0.23	0.16 ± 0.24	0.07 ± 0.04	0.13 ± 0.13	0.21 ± 0.30
Subchronic					
BUN (mg/dl)	21.6 ± 1.3	19.1 ± 0.9	18.8 ± 1.7	18.4 ± 1.8	21.2 ± 1.3
Cr (mg/dl)	0.29 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02
UA (mg/dl)	0.16 ± 0.14	0.12 ± 0.12	0.05 ± 0.07	0.06 ± 0.05	0.09 ± 0.08

BUN: blood urea nitrogen; Cr: Creatinine; UA: uric acid. Values are expressed as mean ± standard deviation. Acute treatment: Control – saline solution (12 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (12 mL/kg); Group I – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (36.06×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (72.12×10^{12} LNC/kg) single dose by ip. Subchronic treatment: Control – saline solution (3 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (3 mL/kg); Group I – LNC (6.01×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (12.02×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg) for 28 days by ip. Data were analyzed by ANOVA. Values are expressed as mean ± standard deviation.

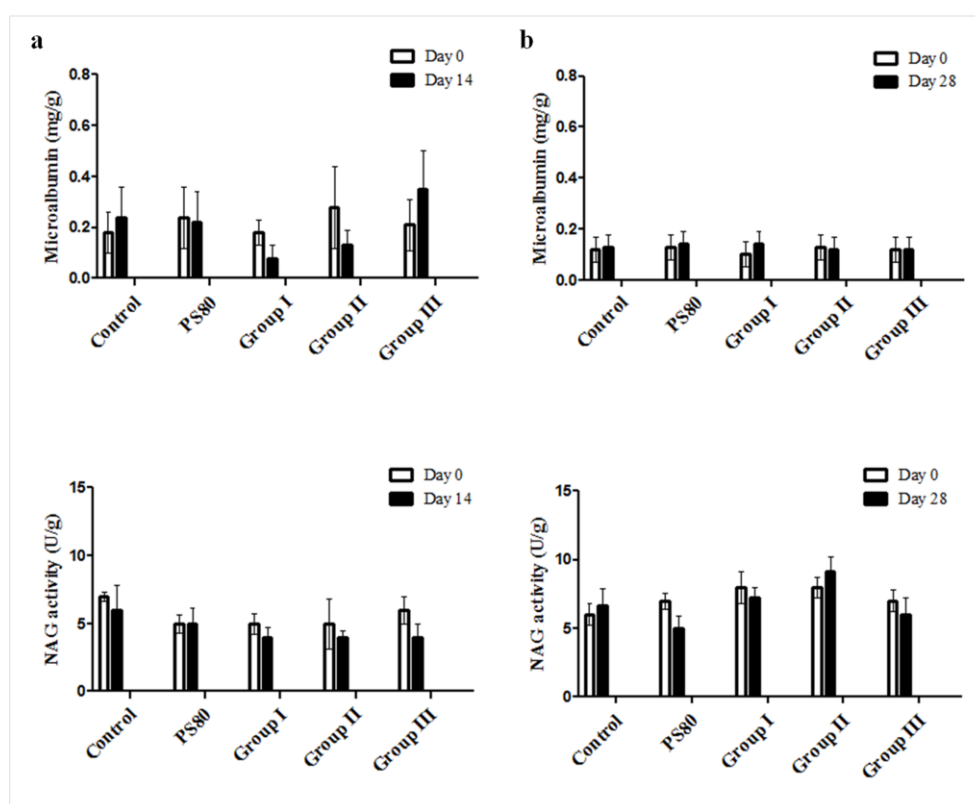


Figure S11. Urinary biomarkers for early kidney injury. Microalbumin: microalbumin/Cr (mg/g); NAG activity: NAG/Cr (U/g). Basal means before administration: In acute and subchronic treatments, we considered the last day of the experiment (14th and 28th day, respectively). In acute treatment, five rats per group received the following: (a) Control – saline solution (12 mL/kg); PS80: polysorbate 0.78% (12 mL/kg); Group I – LNC

(18.03×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (36.06×10^{12} LNC/kg); and Group III – LNC (72.12×10^{12} LNC/kg) in single dose by ip. (b) In subchronic treatment, five rats per group received the following: Control – saline solution (3 mL/kg); PS80: polysorbate 0.78% (3 mL/kg); Group I – LNC (6.01×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (12.02×10^{12} LNC/kg); and Group III – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg) for 28 days by ip. The data were analyzed by ANOVA and by *Repeated measures* one-way ANOVA (to compare Days 0 and 14 and Days 0 and 28).

Table S7. Blood glucose and lipid contents in acute and subchronic treatments (n= 6)

	Control	PS80	Group I	Group II	Group III
Acute					
GLU (mg/dl)	250 ± 33	273 ± 72	255 ± 19	270 ± 32	240 ± 40
TCHO (mg/dl)	52.6 ± 5.8	55.2 ± 6.3	48.0 ± 7.2	50.8 ± 4.0	49.2 ± 7.2
TAG (mg/dl)	74 ± 36	80 ± 28	52 ± 15	68 ± 21	77 ± 38
LDL-C (mg/dl)	17.0 ± 13	17.8 ± 13	17.2 ± 7	14.3 ± 9	14.3 ± 11
HDL-C (mg/dl)	19.6 ± 2.4	21.3 ± 4.8	20.2 ± 2.0	21.7 ± 2.1	19.8 ± 3.0
Subchronic					
GLU (mg/dl)	278 ± 63	306 ± 36	320 ± 39	323 ± 48	311 ± 48
TCHO (mg/dl)	46.3 ± 6.9	46.5 ± 10.5	45.7 ± 11.3	45.7 ± 7.8	41.0 ± 5.0
TAG (mg/dl)	68 ± 14	48 ± 14	70 ± 15	62 ± 22	57 ± 12
LDL-C (mg/dl)	15 ± 2.8	16 ± 4.7	17 ± 5.8	17 ± 8.1	15 ± 3.1
HDL-C (mg/dl)	19.2 ± 2.8	19.5 ± 4.8	17.5 ± 3.8	17.7 ± 3.0	17.5 ± 1.2

GLU: Glucose; TCHO: total cholesterol; TAG: triacylglyceride; LDL-C: low-density lipoprotein; HDL-C: high-density lipoprotein. Acute treatment: Control – saline solution (12 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (12 mL/kg); Group I – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (36.06×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (72.12×10^{12} LNC/kg) single dose by ip. Subchronic treatment: Control – saline solution (3 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (3 mL/kg); Group I – LNC (6.01×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (12.02×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg) for 28 days by ip. Data were analyzed by ANOVA. Values are expressed as mean ± standard deviation.

Table S8. Serum Complement component C3

	Control	PS80	Group I	Group II	Group III
Acute treatment (Day 14)	48.3 ± 2.9	51.9 ± 3.7	48.8 ± 2.1	44.6 ± 1.5	47.8 ± 3.7
Subchronic treatment (Day 0)	58.0 ± 2.9	58.3 ± 1.9	61.5 ± 3.0	60.0 ± 1.5	65.6 ± 1.9
Subchronic treatment (Day 28)	52.0 ± 2.0	55.2 ± 3.7	49.6 ± 1.6	44.1 ± 2.7	52.1 ± 2.7

Acute treatment: Control – saline solution (12 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (12 mL/kg); Group I – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (36.06×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (72.12×10^{12} LNC/kg) single dose by ip. Subchronic treatment: Control – saline solution (3 mL/kg) and PS80: polysorbate 0.78% (3 mL/kg); Group I – LNC (6.01×10^{12} LNC/kg); Group II – LNC (12.02×10^{12} LNC/kg); Group III – LNC (18.03×10^{12} LNC/kg) for 28 days by ip. Data were analyzed by ANOVA and by *Repeated measures* one-way ANOVA (to compare Days 0 and 28). Values are expressed as mean ± standard deviation.

4. CAPÍTULO 2

“In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration”

Artigo aceito na revista *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*
doi: 10.1016/j.ejpb.2013.04.001



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

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



Research paper

In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration

1 Rachel P. Bulcão^{a,b}, Fernando A. de Freitas^{a,b}, Eliane Dallegrave^c, Cristina G. Venturini^d, Marília Baierle^{a,b}, Juliano Durgante^b, Elisa Sauer^{b,e}, Carina Cassini^f, Carlos T. Cerski^g, Paulo Zielinsky^e, Mirian Salvador^f, Adriana R. Pohlmann^{a,h}, Sílvia S. Guterres^{a,d}, Solange C. Garcia^{a,b,*}

^a Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Laboratório de Toxicologia (LATOX), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^d Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Instituto de Cardiologia, Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, Brazil

^f Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil

^g Departamento de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^h Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

5. CAPITULO 3

**“Do Polymeric Lipid-Core Nanocapsules Induce Oxidative, Inflammatory or
DNA Damages After *In Vivo* Subchronic Treatments?”**

Em fase final de redação para submissão a revista *Nanotoxicology*

**DO POLYMERIC LIPID-CORE NANOCAPSULES INDUCE OXIDATIVE,
INFLAMMATORY OR DNA DAMAGES AFTER *IN VIVO* SUBCHRONIC
TREATMENTS?**

(*Nanotoxicology Journal*)

RACHEL P. BULCÃO^{1,2}, GUILHERME BUBOLS^{1,2}, SABRINA N. NASCIMENTO^{1,2},
BRUNA GAUER², ELISA SAUER^{2,3}, MARÍLIA BAIERLE^{1,2}, MARIELE F. CHARÃO^{1,2},
ANGELA MORO^{1,2}, NATÁLIA BRUCKER^{1,2}, CRISTINA G. VENTURINI⁴, CARLOS
SCHNORR⁵, JOSÉ C. F. MOREIRA⁵, ADRIANA R. POHLMANN^{1,4,6}, SÍLVIA S.
GUTERRES^{1,4}, SOLANGE C. GARCIA^{1,2,3*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil* ²*Laboratório de Toxicologia (LATOX), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil* ³*Instituto de Cardiologia, Fundação Universitária de Cardiologia, 90620-000 Porto Alegre, Brazil* ⁴*Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos (SNAF), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil* ⁵*Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, PPG Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil* ⁶*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil*

*Correspondence: Solange C. Garcia, Professor, Laboratório de Toxicologia (LATOX), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Avenida Ipiranga 2752, Santana, 90610-000 Porto Alegre, Brasil; Telephone: +55 513308-5297; Fax: +5551 3308-5437; E-mail: solange.garcia@ufrgs.br

Abstract

The toxicity mechanism of nanoparticles (NPs) is not entirely clear, but possibly more than one mechanism, especially oxidative stress (OS) and inflammation, may be involved in the toxicological response of NPs. The main objective of the present study was evaluated if those mechanisms could be activated by poly(ϵ -caprolactone) (PCL) lipid-core nanocapsules (LCN) following intraperitoneal (ip) and intradermal (id) administration in Wistar rats after subchronic treatment. OS biomarkers, cytokines and DNA damage were analyzed in blood or tissue homogenates. We report that LCN did not induce lipid peroxidation (MDA) in plasma or liver, kidney and heart tissues in both the treatments, except for the brain tissue after the id administration of the highest dose. We also found absence of damages to both blood nonprotein thiol groups (GSH) and protein thiols (ALA-D activity). In contrast, enhanced protein damage by carbonylation was found in the intermediate and highest ip doses and PS80-group compared to saline group as well as higher protein nitrosylation in the highest id dose. In general, no important alterations were found neither in antioxidant enzymes SOD and CAT activities in the different tissues nor in DNA damage in comparison to controls. IL-10 levels were only decreased after the highest id dose and PS80 group compared to saline solution. Overall, the present results demonstrate that the tested LNC especially via ip did not induce those mechanisms to major tissues in a systematic repeated-dose approach, thus providing evidence for a safe use of biodegradable PCL nanocapsules as systemic drug nanocarriers. However, results presented for id route could be due to a local inflammatorial reaction in which resulted in unbalanced OS biomarkers, requiring further investigation.

Keywords: biodegradable, oxidative stress, inflammation, comet assay

Os seres humanos têm sido expostos a partículas nanométricas presentes no ar durante suas fases evolutivas, e estes riscos aumentaram no último século. O rápido desenvolvimento da nanotecnologia resulta em novas fontes de exposição a estas nanopartículas, seja por inalação, ingestão ou injeção, e embora os nanomateriais estejam sendo amplamente utilizados na tecnologia moderna, há falta de informações relativas à saúde humana e às implicações ambientais de nanomateriais (EL-ANSARY e AL-DAIHAN, 2009).

A toxicidade de nanopartículas é um fator importante para avaliar o potencial de novos sistemas carreadores de fármacos. No entanto, não existem testes, protocolos regulamentados, padrões harmonizados, para avaliar a toxicidade das nanopartículas. Entretanto, embora os vários aspectos toxicológicos e a diversidade dos nanomateriais avaliados estejam apenas começando a ser explorados, muitos efeitos nocivos tem sido documentados (WARHEIT *et al.*, 2004; LEWINSKI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009).

Embora seja importante estudar e elucidar a toxicidade de nanopartículas poliméricas biodegradáveis, existem apenas alguns trabalhos relacionados ao seu potencial toxicológico. Na maioria das vezes considera-se que devido ao material *bulk* ser biodegradável e biocompatível, o material nanoestruturado não será tóxico; porém estudos comprovam que a alteração da área de superfície modifica o comportamento, as propriedades físico-químicas, podendo alterar sua toxicidade (AILLON *et al.*, 2009). Ainda hoje, pouco se sabe sobre a possível toxicidade e segurança de nanocápsulas de PCL, e estudos toxicológicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* são escassos, além disso na maioria dos estudos estes nanocarreadores estão encapsulando fármacos, não há ampla investigação conduzida para analisar a toxicidade de nanocarreadores sem fármaco.

As nanocápsulas de núcleo lipídico, preparadas com poli(ϵ -caprolactona) e polissorbato 80, tem apresentado resultados farmacológicos promissores como citado anteriormente. Visando estudar e estabelecer a segurança para o uso clínico, avaliações toxicológicas sistemáticas agudas e subcrônicas, seguindo protocolos como os recomendados pela OECD e pela AFSSAPS, após administração intraperitoneal (i.p.) e intradérmica (i.d.) destas nanocápsulas, foram realizadas em ratos Wistar.

Primeiramente, as suspensões de nanocápsulas foram preparadas através da deposição interfacial do polímero pré-formado de acordo com método previamente

validado por JÄGER e colaboradores (2009) o qual tem sido largamente utilizado para a produção de nanocápsulas. Estas suspensões foram devidamente caracterizadas quanto ao pH, IPD, potencial zeta, tamanho de partícula, distribuição de tamanho, forma, etc. Os resultados estão de acordo com dados anteriores da literatura avaliando estas mesmas formulações, visto que se trata de um método previamente otimizado e validado (VENTURINI *et al.*, 2011).

Como citado anteriormente, ensaios *in vitro* podem apresentar interferências referentes às características físico-químicas das partículas influenciarem nas metodologias utilizadas, além disso, um fator importante nas avaliações tanto *in vitro* quanto *in vivo* é a escolha da dose. Todavia, expressar a dose pela quantidade de nanopartículas por ml, ou ainda pela área de superfície da partícula são as maneiras mais utilizadas. No presente estudo, tanto a dose quanto o volume administrado escolhidos para o estudo piloto foram baseados em estudos anteriores em que estas nanocápsulas foram utilizadas em aplicações terapêuticas (BERNARDI *et al.*, 2008, 2009). No ensaio piloto, os animais foram eutanaziados 48 horas após administração única de $72,12 \times 10^{12}$ LNC/kg (ou 120mg/kg, se expressa por concentração de PCL). Além disso, levou-se em consideração que a maior concentração solúvel e dispersível de PCL foi de 10 mg/ml, limitando assim alterações de concentração por unidade de volume, decidiu-se então administrar o volume máximo permitido para as vias intraperitoneal e intradérmica. Para o tratamento agudo, foram utilizadas três doses, sendo que a dose mais alta foi a mesma utilizada no piloto, porém, diferentemente do teste piloto, os ratos foram sacrificados 14 dias depois, de acordo com protocolos de toxicidade aguda da OECD. As doses utilizadas no teste subcrônico foram escolhidas com base no tratamento agudo.

Após administrações aguda e subcrônica pela via intraperitoneal, nenhum grupo estudado apresentou manifestações clínicas relevantes ou morte; um dado importante foi o acúmulo de formulação na cavidade abdominal dos animais que receberam as doses mais altas de LNC, determinado por MEV e análise do ponto de fusão da PCL, confirmado por posterior análise histopatológica que demonstrou haver formação de um granuloma subcapsular de tipo corpo estranho na camada serosa do baço e do fígado, demonstrando assim, a importância da escolha da dose para realização destes estudos.

Em relação aos marcadores de hepatotoxicidade, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Os marcadores enzimáticos e não enzimáticos de lesão hepática não foram estatisticamente diferentes entre os grupos e todos eles estavam dentro dos valores de referência para ratos Wistar. Esses achados estão de acordo com os resultados histopatológicos em que não foram encontrados focos inflamatórios, vacuolização, infiltrações ou necrose hepática em nenhum dos grupos analisados.

Como estas LNC apresentam forma esférica, é provável que passem através da vasculatura complexa do sistema renal (SAHU e CASCIANO, 2009). FROZZA e colaboradores (2010) avaliaram a distribuição de LNC (preparadas com PCL e PS80) encapsulando trans-resveratrol comparando-as com trans-resveratrol livre em ratos. Evidências geradas a partir deste estudo mostraram que concentrações significativamente elevadas de trans-resveratrol foram transportados por LNC a todos os órgãos analisados em comparação com o trans-resveratrol livre; além disso, a maior concentração de LNC foi encontrada no rim seguida pelo fígado após 14 dias de tratamento via i.p. (FROZZA *et al.*, 2010). Devido a isso, marcadores renais usuais sanguíneos, como ureia, ácido úrico e creatinina; e marcadores urinários de dano precoce como a microalbuminúria, marcador de dano glomerular, e a atividade da enzima NAG, marcador de dano tubular foram analisados. Considerando os resultados obtidos na quantificação de marcadores usuais e precoces, além da ausência de alteração na análise histopatológica dos rins, as LNC não ocasionaram nefrotoxicidade nas condições do experimento.

Para avaliar um possível desequilíbrio no metabolismo dos lipídios e da glicose, marcadores bioquímicos foram quantificados. Os valores de glicose, lipídios e butirilcolinesterase (BuChE) não apresentaram diferença significativa em nenhuma das doses em ambos os experimentos. A enzima BuChE tem sido encontrada em muitos tecidos de animais, desempenhando papel importante no metabolismo de lipídios e de lipoproteínas de baixa densidade, além de ser largamente estudada também como marcador de inflamação (DAS, 2006; 2007). No caso específico de relação com o metabolismo de lipídios, quando o fígado é submetido a uma lesão, a actividade da BuChE é elevada, levando à insuficiência no metabolismo de lipídios e de lipoproteínas de baixa densidade (MA *et al.*, 2009). Em ambos os estudos, agudo e subcrônico, pela via intraperitoneal, a atividade da BuChE não foi estatisticamente diferente entre os grupos e não houve correlação entre estes marcadores. Estes

resultados estão de acordo com os resultados obtidos para o perfil lipídico indicando que as LNC não causaram desequilíbrio do metabolismo dos lipídios e da glicose em ratos Wistar.

O complemento C3 é um marcador de imunotoxicidade e estudos anteriores demonstraram a sua interação com nanopartículas em sistemas biológicos (SALVADOR-MORALES *et al.*, 2006; HIGASHISAKA *et al.*, 2011). No presente estudo houve uma leve, porém não significativa, diminuição do C3 nos tratamentos agudos e subcrônicos. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, como o relatado por MOSQUEIRA e colaboradores (2001), que examinaram várias modificações da superfície de NC contendo PLA, PLGA e PCL, e também observaram mudanças em seu conteúdo de fosfolipídios (PL) na ativação do complemento, concluindo que essas alterações podem reduzir a ativação do complemento (MOSQUEIRA *et al.*, 2001). Diminuindo os níveis de C3 significa que uma das vias do complemento foi ativada e está associada com alguma perturbação na cascata do complemento.

Em relação ao estudo da possível hematotoxicidade ocasionada por estas LNC, foram encontradas certas flutuações entre os grupos, porém na faixa de valores normais e que não indicam qualquer perturbação relevante. Em ambos os tratamentos, as células vermelhas do sangue (RBC) estavam significativamente maiores nos animais tratados com LNC ($p < 0,05$). De acordo com outros estudos, níveis elevados de RBC podem refletir sua superprodução em resposta à lesão tecidual (DANDEKAR *et al.*, 2010). É bem conhecido que os eritrócitos ocupam uma fração maior do que células mononucleares fagocíticas no sangue, de modo que quando ocorre administração de nanopartículas, é provável que interajam com as células vermelhas do sangue antes de encontrar outras células imunes (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2008). No entanto, esses achados podem também ser interpretados como acidentais, e não indicam uma tendência de toxicidade; além disso os valores encontram-se dentro do intervalo de referência para ratos Wistar. Em relação às células brancas, apenas a contagem de monócitos estava aumentada nos grupos tratados com LNC no tratamento agudo ($p < 0,05$). De acordo com SHAW e colaboradores, o aumento da fração de monócitos pode ser um sinal de inflamação (SHAW *et al.*, 2008). Além disso, os monócitos podem fagocitar certas nanopartículas mais do que muitos outros tipos celulares (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2007). Entretanto, mais estudos são necessários para verificar se as alterações em

monócitos são associadas com outros fenótipos imunes (SHAW *et al.*, 2008) ou se houve, por exemplo, alguma influência metodológica. Assim, a fim de verificar se houve interferência na metodologia utilizada para contagem hematológica, realizou-se um teste preliminar *in vitro* utilizando o mesmo equipamento rotineiramente utilizado para contagem total de células sanguíneas.

Após os testes realizados, demonstrados no CAPÍTULO 1 - Manuscrito 1, pode-se observar que tal influência poderia existir, entretanto testes mais específicos, incluindo testes *in vivo* necessitam ser melhor investigados. Alternativamente, contagens poderiam ser realizadas de acordo com protocolos padrão, utilizando numeração visual de células em câmara de contagem de Neubauer, por exemplo. Com base nisto, novos métodos para a avaliação hematológica após exposição a nanopartículas irão tornar-se atraentes no futuro para a obtenção de resultados confiáveis em estudos realizados *in vivo*.

Quanto à realização do estudo toxicológico pela via intradérmica, CAPÍTULO 2 – Manuscrito 2, não foram observados sinais clínicos ou alterações fisiológicas no estudo de dose única. O mesmo ocorreu no teste de doses repetidas, em que os ratos não apresentaram qualquer sinal de toxicidade durante os 28 dias do período de administração. O grupo que recebeu PS80 (Tween 80) demonstrou uma redução no peso corporal relativo após o 21^o dia. Esta alteração foi observada juntamente com a diminuição no consumo de ração e água, o que ocorreu também com os grupos que receberam as doses mais alta (5.4×10^{12} LNC/kg) e intermediária (3.6×10^{12} LNC/kg) de LNC, porém estas alterações foram transitórias para estes grupos, exceto para o grupo que recebeu Tween 80, o que pode ser atribuído, pelo menos em parte, a irritação local induzida pelo tensoativo; no entanto, não há estudos avaliando tal efeito intradérmico.

Além disso, não houve alterações macroscópicas ou histopatológicas em nenhum dos grupos testados. Não foram realizadas análises histológicas do local de aplicação devido a interferência que poderia ocorrer pela administração repetida. Assim como ocorreu após administração intraperitoneal, não foram encontradas alterações em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados, exceto a atividade da enzima butirilcolinesterase, que estava diminuída nos animais que receberam a dose mais alta. Estudos recentes demonstram que a acetilcolina tem importantes ações anti-inflamatórias (DAS, 2007). A acetilcolina, bem como outros ésteres de colina são rapidamente hidrolisados pela acetilcolinesterase (AChE) e pela BuChE

(MESULAM *et al.*, 2002). Um aumento na atividade das enzimas AChE e BuChE poderia levar à diminuição de níveis de ACh, reduzindo seus efeitos anti-inflamatórios devido à ausência do controle de feedback negativo exercido pela ACh. Dessa forma, considerando o efeito inflamatório supressor da ACh, é concebível que as enzimas AChE e BuChE sejam reguladoras intrínsecas da inflamação (DAS, 2007). Nos ratos que receberam LNC pela via intraperitoneal, a atividade da BuChE também estava diminuída nos grupos que receberam as suspensões de nanocápsulas, entretanto não houve diferença significativa. Há evidências em trabalhos anteriores (BERNARDI *et al.*, 2009), que LNC poderiam reduzir as respostas inflamatórias. No entanto, marcadores inflamatórios específicos devem ser analisadas, bem como investigar outros possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na diminuição da atividade da BuChE. Além disso, diferentes tipos de glóbulos brancos também desempenham um papel essencial na resposta inflamatória. A avaliação dos efeitos de nanomateriais sobre os monócitos/macrófagos e neutrófilos é uma das mais importantes em termos de resposta aguda inflamatória intravascular (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2008). Contrariamente à atividade da BuChE, a contagem de leucócitos estava aumentada após dose única de LNC e após o tratamento com doses repetidas nos grupos que receberam Tween e a dose mais alta ($p < 0,05$). A ativação de células inflamatórias, tais como neutrófilos, pode ser induzida por fagocitose de nanopartículas, podendo gerar ERO e ERN (BUZEA *et al.*, 2007). A interferência metodológica não foi avaliada neste caso devido ao pequeno volume administrado de formulação, sendo, portanto, provavelmente absorvido e metabolizado antes das análises laboratoriais.

Ainda, após administração intradérmica, foi avaliado o potencial genotóxico através do ensaio cometa. Como mencionado anteriormente por OESCH e LANDSIEDE (2011), estudos de genotoxicidade *in vivo* após administração de NPs possuem vantagens sobre testes *in vitro*, dada a natureza complexa da dispersão de nanomateriais no ar ou em líquidos (aerossóis ou suspensões) e do complexo processo de sua absorção, deposição e distribuição no corpo. O mecanismo de toxicidade de nanocarreadores geralmente envolve danos ao DNA. O ensaio cometa é um método sensível para detecção de danos de nanopartículas ao DNA com aplicações em testes de genotoxicidade e epidemiologia molecular, bem como a investigação de danos e reparo ao DNA (VANDGHANOONI e ESKANDANI, 2011). Corroborando com nossos achados, atuais estudos de genotoxicidade sugerem que

alguns nanopolímeros apresentam nenhum ou limitado dano ao DNA; esses estudos mostraram também propriedades anti-inflamatórias de alguns nanocarreadores poliméricos (HE *et al.*, 2009; CHAUHAN *et al.*, 2009).

Como citado no CAPÍTULO 3 – Manuscrito 3, possíveis mecanismos de toxicidade poderiam estar envolvidos com a exposição a LNC, visto que existem relatos na literatura de que NPs, de uma maneira geral, induzem a geração de estresse oxidativo por diversos mecanismos (FERNÁNDEZ-URRUSUNO *et al.*, 1997; NEL *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2006; VERMA e STELLACCI, 2010; KENZAOUI *et al.*, 2012).

Biomarcadores do estresse oxidativo e marcadores inflamatórios foram quantificados após a exposição subcrônica, por ambas as vias. O ensaio cometa havia sido analisado apenas após administração intradérmica; no manuscrito 3 foi demonstrada a ausência de genotoxicidade após administração ip. Após análise sanguínea e tecidual no tratamento pela via ip, foi demonstrada uma diminuição da lipoperoxidação, e um leve aumento da oxidação de proteínas; porém enzimas antioxidantes estavam aumentadas para contrabalancear estes valores, o que foi comprovado pela regressão linear. Os valores reduzidos de MDA estão de acordo com um estudo prévio realizado por KÜLKAMP e colaboradores (2011), que estudaram a extensão da peroxidação lipídica através da quantificação de TBARS, produto da peroxidação lipídica, *in vitro* de uma formulação de LCN contendo ácido lipóico. O efeito antioxidante da formulação com 10 mg/ml de PCL foi significativamente maior, e com o aumento no conteúdo de polímero nas formulações este aumento foi progressivo (KÜLKAMP *et al.*, 2011). No presente estudo, antioxidantes endógenos como GSH e a atividade da enzima ALA-D apresentaram valores semelhantes entre os grupos, porém mais estudos são necessários para avaliar a capacidade antioxidante destas nanocápsulas.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO e colaboradores (1997) avaliaram possíveis modificações em marcadores do EO em hepatócitos após administrações única e repetida de nanopartículas poliméricas. A fagocitose realizada por macrófagos é acompanhada por um aumento na secreção de citocinas, enzimas, ER, dentre outros. Sabe-se ainda que a degradação de materiais biodegradáveis pode resultar em resposta inflamatória, podendo levar ao estresse oxidativo (WATTAMWAR *et al.*, 2011). Com base nisto, marcadores inflamatórios, juntamente com marcadores do estresse oxidativo foram quantificados. Além disso, o aumento da geração de ER

pode levar a um dano ao DNA. CALARCO e colaboradores (2013) avaliaram a genotoxicidade após exposição a NPs, devido ao comportamento genotóxico dos materiais que constituem as NPs ser diferente da sua forma *bulk*. Outros pesquisadores demonstraram que NPs podem gerar resposta inflamatória, a qual irá contribuir para a geração de ER e conseqüentemente poderá ocasionar dano ao DNA (SCHINS e KNAAPEN, 2007). Os resultados encontrados no presente trabalho não indicaram genotoxicidade após administração ip, visto que não houve dano ao DNA demonstrado através do ensaio cometa. Em relação aos marcadores inflamatórios, que podem estar envolvidos tanto com o EO quanto com possível efeito genotóxico, não houve diferença entre os grupos nos níveis das interleucinas IL-6 e IL-10, além disso, os valores de PCR estavam reduzidos em todos os grupos como foi observado nos CAPÍTULOS 1 e 2.

Após administração pela via id, foram encontradas alterações nos biomarcadores de oxidação de proteínas, PCO e 3-NT, nos grupos que receberam PS80 e a maior dose, respectivamente. Além disso, o grupo III apresentou atividade significativamente elevada da enzima SOD, entretanto não houve correlação entre os níveis de 3-NT e a atividade da SOD. Apesar da diferença significativa encontrada, o aumento foi leve, e provavelmente esta alteração enzimática seja suficiente para contrabalancear este aumento. No CAPÍTULO 2 – Manuscrito 2, foram encontrados valores baixos de PCR, e a maioria das alterações foram encontradas no grupo que recebeu PS80. O mesmo ocorreu no CAPÍTULO 3 – Manuscrito 3, em que a maioria das alterações foram ou no grupo PS80 ou no grupo III, que possui a maior concentração de PS80 na formulação. Corroborando com estes resultados, os níveis de IL-10, marcador anti-inflamatório, estava diminuído nestes mesmos grupos. Houve correlação negativa entre o marcador de dano às proteínas e IL-10, sendo confirmada pela regressão linear, sugerindo que o aumento de 3-NT tenha influenciado na secreção desta interleucina.

Assim como o presente estudo, FERNÁNDEZ-URRUSUNO e colaboradores (1997) relataram que apesar da alteração encontrada nos antioxidantes, esta não foi suficiente para iniciar um processo oxidativo, visto que não houve lipoperoxidação e as alterações observadas eram reversíveis.

Malondialdeído, SOD e CAT foram quantificados no fígado, rins, coração e cérebro de todos os ratos tratados em ambos os estudos. Os valores de MDA encontrados no fígado, após tratamento pela via ip, foram similares aos valores

encontrados no sangue. É provável que LCN apresentem uma tendência a diminuir a lipoperoxidação, porém este mecanismo deve ser explorado. Em um estudo recente, BERNARDI e colaboradores (2009) reportaram uma diminuição na resposta inflamatória, após administração de volumes baixos de LNC. No presente estudo, após administração ip, os níveis de IL-6 e IL-10 foram semelhantes entre os grupos, como citado anteriormente. Os outros tecidos apresentaram valores semelhantes de MDA. Poucas alterações nos antioxidantes foram encontradas nos tecidos, apenas uma leve diminuição na atividade da CAT no fígado e coração. Por outro lado, a atividade da SOD foi similar entre os grupos, com uma leve tendência a aumentar. No cérebro houve correlação positiva entre MDA vs. SOD e negativa entre MDA vs. ALA-D, confirmada após regressão multivariada.

Como citado anteriormente, nos Manuscritos 1 e 2, os marcadores de dano hepático e renal não apresentaram diferenças entre os grupos em ambos os estudos, juntamente com a ausência de alteração dos achados histopatológicos e de alteração do peso relativo dos órgãos. O coração e o cérebro não apresentaram diferenças histopatológicas ou alteração do peso; além disso, poucos marcadores para avaliar alterações nestes tecidos foram analisados, somente a enzima LDH e a PCR, que são marcadores inespecíficos, e a BuChE que tem sido encontrada em vários tecidos, incluindo o cérebro; contudo nenhum destes marcadores apresentou alterações em todos os animais testados após administração ip.

Após tratamento pela via id, alterações foram encontradas apenas nos rins e no cérebro dos grupos que receberam PS80, como aumento na atividade da CAT e SOD nos rins e do MDA no cérebro. Além disso, os animais do grupo III, que receberam a dose mais alta de LNC, com concentrações maiores de PS80 na formulação, apresentaram um aumento na atividade da SOD nos rins e valores elevados de MDA no cérebro, resultado semelhante ao grupo PS80. Como mencionado anteriormente, dentre os parâmetros analisados, apresentados no Manuscrito 2, a maioria estava inalterada, exceto nos animais que receberam PS80, os quais apresentaram pequenas alterações. É importante salientar que o PS80 é permitido para administração parenteral, além disso, o polissorbato presente na extremidade das nanocápsulas não apresenta exatamente as mesmas propriedades que o PS80 utilizado como controle, porém seu uso como controle é indicado.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho realizamos a avaliação toxicológica de nanocápsulas de núcleo lipídico, de poli(ϵ -caprolactona), polímero biodegradável, utilizadas como carreadoras de fármacos. As avaliações toxicológicas agudas e subcrônicas foram feitas após administrações intraperitoneal e intradérmica em ratos Wistar machos. Não foram observados sinais clínicos ou alterações fisiológicas relevantes nos animais submetidos aos testes, apenas diminuição do peso corporal em alguns grupos tratados com as formulações e com polissorbato, entretanto esta alteração foi transitória.

A avaliação do efeito das LNC sobre os tecidos, através de análises histopatológicas, macroscópicas e peso relativo dos órgãos mostrou em ambas as vias, tanto na avaliação aguda quanto na subcrônica que não houve indicativo de toxicidade em nenhum destes parâmetros. As alterações observadas foram, provavelmente, devido ao acúmulo da suspensão de LNC na cavidade abdominal, após administração pela via ip, ocasionando uma reação na camada serosa do baço e do fígado devido ao volume administrado, impedindo que as doses mais altas administradas fossem absorvidas.

Em relação à hepatotoxicidade, não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros analisados, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos em ambos os estudos, corroborando com os achados histopatológicos.

Quanto à avaliação da nefrotoxicidade, não houve alteração nos marcadores sanguíneos analisados, porém estes marcadores são tardios. Devido a isto, em ambos os estudos foram realizadas coletas de urina basal e no final dos experimentos para quantificação de biomarcadores precoces de dano renal. Não houve alteração em nenhum destes marcadores, tanto do biomarcador de dano glomerular quanto tubular. Nas condições do experimento, tanto nas análises histopatológicas quanto nas análises laboratoriais, não houve nefrotoxicidade após administração de LNC após exposições únicas e repetidas.

Quanto aos outros parâmetros bioquímicos, apenas foi observada uma leve, porém não significativa, diminuição do complemento após administração ip de LNC, indicando que possa ter ocorrido uma ativação da cascata. Após administração id, somente a BuChE apresentou diferença significativa, estando diminuída

comparando o grupo que recebeu a dose mais alta com o grupo controle; em estudos recentes, juntamente com a AChE, a BuChE tem sido demonstrada como moduladora no processo inflamatório, além de estar alterada em diferentes patologias. Entretanto, não houve correlação com outros marcadores inflamatórios avaliados neste estudo.

Em relação aos possíveis mecanismos de toxicidade envolvidos após administração de LNC, também foi demonstrado que nas condições dos experimentos, os animais não apresentaram resultados intensos o suficiente para iniciar um processo oxidativo, visto que não houve peroxidação lipídica nem depleção de antioxidantes; além disso, não houve dano ao DNA nem resposta inflamatória nos animais tratados com LNC. Um aumento na produção de ERO resulta em EO quando as células não conseguem compensar a formação de ERO e conseqüentemente não conseguem manter ou restaurar as condições normais fisiológicas de funções reguladoras redox, ocasionando resultados toxicológicos, como dano ao DNA e expressão de citocinas inflamatórias, por exemplo. Contudo, isto não foi observado no presente estudo, visto que as defesas antioxidantes estavam similares entre os grupos que receberam solução salina, polissorbato e as formulações de LNC, prevenindo ou revertendo assim, possíveis danos oxidativos, como a lipoperoxidação. Os resultados, portanto, sugerem a possibilidade de os antioxidantes terem sido úteis na prevenção/reversão de possíveis danos oxidativos e/ou inflamatórios induzidos pela exposição de LNC, mesmo os animais tendo apresentado valores leves de indução, além disso, de acordo com uma hipótese hierárquica do estresse oxidativo, o menor nível de estresse está associado com a indução de antioxidantes e detoxificação por enzimas (XIAO *et al.*, 2003).

Como foi citado anteriormente, os resultados encontrados mostraram leves alterações em marcadores inflamatórios e imunológicos como complemento, BuChE, neutrófilos, monócitos, IL-10, indicando a necessidade de quantificação de outros marcadores para uma avaliação global deste processo. Entretanto, as alterações encontradas não correlacionaram entre si, não houve correlação entre parâmetros hematológicos, BuChE, PCRus, C3, IL-6 e IL-10. Além disso, serão realizados testes *in vitro* através de contagens manuais e automatizadas para elucidar a interferência metodológica encontrada em alguns parâmetros hematológicos após administração

de maiores volumes de formulação. Também serão realizadas análises em diferentes meios, com diferentes valores de pH para saber se há aglomeração destas LNC, ou se estas podem desviar a luz em análises espectroscópicas.

Mais experimentos, ainda, deverão ser conduzidos para avaliar a diminuição encontrada nos biomarcadores de lipoperoxidação, além disso, é necessária a confirmação da ausência de dano ao DNA através da quantificação da frequência de micronúcleos (MN). De modo geral, visto que muitos destes marcadores são inespecíficos, é necessária a continuidade destes estudos toxicológicos, e como citado anteriormente, estudos complementares *in vitro* são importantes para avaliar mecanismos específicos e se existe correlação entre os achados *in vivo/in vitro*.

Como sugerido por Nel e colaboradores (2006), interações de NPs com o organismo podem resultar em estresse oxidativo, inflamação e outras formas de injúria, como desnaturação de proteínas, dano às membranas, dano ao DNA, imunotoxicidade, e a formação de granulomas de corpo estranho. O *screening* toxicológico realizado no presente trabalho abordou a maioria destas possíveis injúrias e nos permitiu concluir que os grupos que receberam as doses mais baixas e intermediárias não apresentaram toxicidade em ambos os tratamentos.

Em resumo, com os resultados obtidos até o momento pode-se concluir que nas condições dos experimentos, tanto pela via ip quanto pela via id, não foram demonstrados danos teciduais e os achados laboratoriais foram condizentes com os histopatológicos, sendo estas nanocápsulas, do ponto de vista toxicológico, promissoras como carreadoras de fármacos; entretanto estudos utilizando outras vias, como a via oral, intravenosa, bem como avaliação da toxicidade crônica, são necessários. Porém, qualquer avaliação nesta linha é importante e pode embasar a avaliação da resposta tóxica e, conseqüentemente, levar ao estabelecimento de regulamentações na avaliação da toxicidade de nanopartículas poliméricas biodegradáveis utilizadas como carreadoras de fármacos.

8. REFERÊNCIAS

AFSSAPS, Guidance Document on the AFSSAPS, French Agency for Safety of Health Products. **Recommendations for Toxicological Evaluation of Nanoparticle**; 2009. Available online at <http://www.afssaps.fr>.

AFSSAPS, Guidance Document on the AFSSAPS, French Agency for Safety of Health Products. **Recommendations for Toxicological Evaluation of Nanoparticle**; 2011. Available online at <http://www.afssaps.fr>.

AILLON, K. L.; XIE, Y.; EL-GENDY, N.; BERKLAND, C.J.; FORREST, M. L. Effects of nanomaterials physicochemical properties on in vivo toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 457-466, 2009.

AITKEN, R. J.; HANKIN, S. M.; ROSS, B.; TRAN, C. L.; STONE, V.; FERNANDES, T. F.; *et al.* EMERGNANO: A review of completed and near completed environment, health and safety research on nanomaterials and nanotechnology. Report TM/09/01. Defra Project CB0409. **Institute of Occupational Medicine**. 2009.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p.215–220, 2007.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993. Available: <http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/R-589.pdf>

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutica Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p.163-71, 2000.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; MENEGHETTI, A. *et al.* Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by A β 1-42 in Alzheimer's disease models. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.4927-4942, 2012.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JAGER, E.; FIGUEIRO, F.; EDELWEISS, M, I.; POHLMANN, A R; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, p. 53-63, 2009.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C. *et al.* Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, v.586, p. 24-34, 2008.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 308-17, 2011.

BORM, P.; KLAESSIG, F. C.; LANDRY, T. D.; *et al.* "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles". **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 1, p. 23–32, 2006.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P.; Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 54, p. 631-651, 2002.

BUZEA, C.; PACHECO, I.I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, p. 17–71, 2007.

CALARCO, A.; BOSETTI, M.; MARGARUCCI, S.; FUSARO, L.; NICOLI, E.; PETILLO, O.; CANNAS, M.; GALDERISI, U.; PELUSO, G. The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells. **Toxicology Letters**, v. 218, p. 10-17, 2013.

CATTANI, V. B.; FIEL, L. A.; JAGER, A.; JAGER, E.; COLOME, L. M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, p.116–124, 2010.

CHAUHAN, A. S.; DIWAN, P. V.; JAIN, N. K.; TOMALIA, D. A. Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. **Biomacromolecules**, v. 10, p.1195–1202, 2009.

CHEN, L.; HENEIN, G.; LUCIANI, V. Nanofabrication techniques for controlled drug-release devices. **Nanomedicine**, v.6, n.1, p.1-6, 2011.

CHEN, Y. S.; HUNG, Y. C.; LIAU, I.; HUANG, G. S. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v.4, p.858-64, 2009.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, p.99-134, 2002.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198–205, 2006.

DANDEKAR, P.; DHUMAL, R.; JAIN, R.; TIWARI, D.; VANAGE, G.; PATRAVALE, V. Toxicological evaluation of pH-sensitive nanoparticles of curcumin: Acute, sub-acute and genotoxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 2073-89, 2010.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, v. 13, p. 214-221, 2007.

DAS, U. N. Clinical laboratory tools to diagnose inflammation. **Advances in Clinical Chemistry**, v.41, p.189–229, 2006.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n.2, p.589-605, 2010.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; AGGARWAL, P.; HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Molecular Pharmacology**, v. 5, p.487–495, 2008.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S.E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n.8, p. 469-78, 2007.

DONALDSON, K.; AITKEN, R.; TRAN, L.; STONE, V.; DUFFIN, R.; FORREST, G.; ALEXANDER, A. Carbon nanotubes; a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. **Toxicological Sciences**, v. 92, p.5-22, 2004.

DONALDSON, K.; BORM, P. J.; CASTRANOVA, V.; GULUMIAN, M. The limits of testing particle-mediated oxidative stress in vitro in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v.6, n.13, 2009.

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: An overview. **Journal of Toxicology**. 2009. doi:10.1155/2009/754810

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, n.2, p. 129-137, 2012.

FARAJI, A.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.17, p.2950–62, 2009.

FARIA, H.C.I.T. **Estudo Comparativo de Citotoxicidade e Internalização de Nanopartículas de Ouro com Diferentes Revestimentos**. Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense. Universidade do Porto, 2010

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R.; FATTAL, E. ; FÉGER, J. *et al.* Evaluation of hepatic antioxidant systems after intravenous administration of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v.18, p.511–17, 1997.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, 161-171, 2005.

FISCHER, H.C.; CHAN, W.C.W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, n.6, p.565-71, 2007.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; DA SILVA, T.; BATTASTINI, A. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue

distribution studies in rats. **Journal of Biomededical Nanotechnology**, v.6, p.694-703, 2010.

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

GOLDIM, J. R. A Avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista HCPA**, v.27, n.1, p.66-73, 2007.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. **Preparação e Aplicações de Nanopartículas para a Liberação Controlada de Fármacos**, In: Morales, M. Terapias Avançadas: Células Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia, Atheneu, 2007

HAAS, S. E.; BETTONI, C. C.; OLIVEIRA, L. K.; GUTERRES, S. S.; DALLA COSTA, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against plasmodium berghei *in vivo*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.34, p.156-161, 2009.

HAGENS, W.I.; OOMEN, A.G.; DeJONG, W.H.; CASSEE, F.R.; SIPS, A. J. A. M. "What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?" **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 49, n. 3, p. 217–229, 2007.

HE, L.; YANG, L.; ZHANG, Z. R.; GONG, T.; DENG, L.; GU, Z.; SUN, X. In vitro evaluation of the genotoxicity of a family of novel MeO-PEG-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-PEG-OMe triblock copolymer and PLGA nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 20, n. 45, p. 455102, 2009.

HIGASHISAKA, K.; YOSHIOKA, Y.; YAMASHITA, K.; MORISHITA, Y.; FUJIMURA, M.; NABESHI, H. et al. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. **Biomaterials**, v. 32, p.3-9, 2011.

HU, X., *et al.* In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3070-3072, 2009.

HUANG, Y.; GAO, H.; GOU, M.; YE, H.; LIU, Y.; GAO, Y.; *et al.* Acute toxicity and genotoxicity studies on poly(varepsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(varepsilon-caprolactone) nanomaterials. **Mutation Research**, v. 696, n. 2, p.101-6, 2010.

ICH. **Good Clinical Practices (GCP)**. 1996. Disponível em http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002874.pdf

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.338, p.297-305, 2007.

JAIN, K. K. The role of nanobiotechnology in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 10, n. 2, p. 1435-1445, 2005.

KARLSSON, H. L.; CRONHOLM, P.; GUSTAFFSON, J.; MÖLLER, L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. **Chemical Research of Toxicology**. v.21, p. 1726-1732, 2008.

KENZAOU, B. H.; BERNASCONI, C. C.; GUNAY-AYRA, S.; JUILLERAT-JEANNERET, L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. **Biochemical Journal**, v. 441, p. 813–821, 2012.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. **Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons**. 6 ed. New York, McGraw Hill. 2001.

KLIMUK, S. K.; SEMPLE, S. C.; NAHIRNEY, P. N. et al., "Enhanced anti-inflammatory activity of a liposomal intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide in an acute model of contact hypersensitivity," **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, n. 2, p. 480–488, 2000.

KULKAMP, I. C.; RABELO, B. D.; BERLITZ, S. J.; ISOPPO, M.; BIANCHIN, M. D.; SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Nanoencapsulation improves the in vitro antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 598–607, 2011.

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

LEE, L. A.; WANG, Q. Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine**, v.2, n.3, p. 137-149, 2006.

LEHR, C. M.; DAUM, N.; SCHNEIDER, M. SCHAFER, U. F. Biological barriers - a need for novel tools in nanotoxicology and nanomedicine. Preface. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 337, 2011.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v.4, p. 26-49, 2008.

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

LIU, Y. *et al.* Preparation and characterization of α -galactosidase-loaded chitosan nanoparticles for use in foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1162-1168, 2011.

LIU, W.; WU, Y.; WANG, C.; LI, H. C.; WANG, T.; LIAO, C. Y.; *et al.* Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319-30, 2010.

LU, Y.; CHEN, S. C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1621-33. 2004.

MA, L. L.; ZHAO, J. F.; WANG, J.; LIU, J.; DUAN, Y. M.; LIU, H. T.; *et al.* The acute liver injury in mice caused by nano-anatase TiO₂. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, p. 1275-85, 2009.

MARQUIS, B. J.; LOVE, S. A.; BRAUN, K. L.; HAYNES, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**, v. 134, n. 3, p. 425-39, 2009.

MAUPAS, C.; MOULARI, B.; BEDUNEAU, A.; LAMPRECHT, A.; PELLEQUER, Y. Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p.136-41, 2011.

MAURER-JONES, M. A.; HAYNES, C. L. Toward correlation in in vivo and in vitro nanotoxicology studies. **Journal of Law, Medicine & Ethics**, v.40, n.4, p. 795-801, 2012.

MAURER-JONES, M. A.; BANTZ, K. C.; LOVE, S. A.; MARQUIS, B. J.; HAYNES, C. L. **Toxicity of Therapeutic Nanoparticles**, Nanomedicine, no. 2, 2009.

MAYNARD, A. D.; WARHEIT, D. B.; PHILBERT, M. A. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. **Toxicological Sciences**, v.120, p. 109-29, 2011.

MENARD, A.; DROBNE, D.; JEMEC, A.; Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 677-684, 2011.

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, **Neuroscience**, v. 110, p.627–639, 2002.

METCALFE, C.; BENNETT, E.; CHAPPELL, M.; STEEVENS, J.; DEPLEDGE, M.; GOSS, G.; GOUDEY, S.; KACZMAR, S.; O'BRIEN, N.; PICADO, A.; RAMADAN, A. SMARTEN: **Strategic Management and Assessment of Risks and Toxicity of Engineered Nanomaterials**, p. 93-108, In I. Linkov and J. Steevens, eds. Nanotechnology: Risks and Benefits. Springer, The Netherlands, 2008.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; TRAN, C. L. **Nanotoxicology – Characterization, Dosing and Health Effects**. In: Edited by Nancy A. Monteiro – Riviere and C.Lang Tran, Informa healthcare. New York, 2007.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; *et al.* Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-79, 2001.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-7, 2006

NIGHSWONGER, G. A Medical Device Link MD & DI column: **new polymers and nanotubes add muscle to prosthetic limbs**, <http://www.devicelink.com/mddi/archive/99/08/004.html>. 1999

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles," **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823–839, 2005.

OBERDÖRSTER, G.; STONE, V.; DONALDSON, K. "Toxicology of nanoparticles: a historical perspective," **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 2–25, 2007.

OECD **Programme on the Safety of Manufactured Nanomaterials 2009-2012** Operational Plans of the Projects. No. 21 - ENV/JM/MONO, 2010. <http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publicationsintheseriesonthesafetyofmanufacturednanomaterials.htm>. Acessado em 20 de fevereiro de 2013

OECD. Test Guideline 407. **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. In: *OECD Guidelines for the testing of chemicals*. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris, 1995.

OECD. Test Guideline 420. **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method**. In: *OECD Guidelines for the testing of chemicals*. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris, 2001.

OESCH, F.; LANDSIEDEL, R. Genotoxicity investigations on nanomaterials. **Archives of Toxicology**, 2012. doi: 10.1007/s00204-012-0838-y

OSTIGUY, C.; LAPOINTE, G.; MÉNARD, L.; CLOUTIER, Y.; TROTTIER, M.; BOUTIN, M.; *et al.* **Nanoparticles actual knowledge about occupational health and safety risks and prevention measures**. Studies and Research Projects, Report R-470, IRRST, Montréal, 2007.

OSTIGUY, C.; ROBERGE, B.; MÉNARD, L.; ENDO, C. **A Best Practices Guide to Synthetic Nanoparticle Risk Management. Chemical Substances and Biological Agents Studies and Research Projects**. Report R-599, IRRST, Montréal . 2009. Available:<http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/R-599.pdf>

OSTIGUY, C.; SOUCY, B.; LAPOINTE, G.; WOODS, C.; MÉNARD, L.; TROTTIER, M. **Health Effects of Nanoparticles. Chemical Substances and Biological Agents** Studies and Research Projects, Report R-589, IRRST, Montréal, 2008.

OSTROWSKI, A. D.; MARTIN, T. L.; CONTI, J.; HURT, B.; HARTHORN, H. Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007. **Journal of Nanoparticle Research**. v. 11, n.2, p. 251–257, 2009.

PEN. **The nanotechnology consumer products inventory**. Available from: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/. Washington DC: Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2011.

POWERS, K. W.; PALAZUELOS, M.; MOUDGIL, B. M.; ROBERTS, S. M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. **Nanotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 42–51, 2007.

RAYMAN-RASMUSSEN, J. P.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. “Variables influencing interactions of uncharged quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators”. **Nano Letters**. v.7, n.5, p. 1344–1348, 2007.

SAHU, S.; CASCIANO, D. **Nanotoxicity: from *in vivo* and *in vitro* models to health risks**. Wiley, John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

SALVADOR-MORALES, C.; FLAHAUT, E.; SIM, E.; SLOAN, J.; GREEN, M. L. H.; SIM, R. B. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 193-201, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p.726-37, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. ; MEZZALIRA, G. ; GUTERRES, S. S. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.3, p. 562-569, 2006.

SCHINS, R. P.; KNAAPEN, A. M. Genotoxicity of poorly soluble particles. **Inhalation Toxicology**, v.19, p.189–198, 2007

SHAW, S. Y.; WESTLY, E. C.; PITTET, M. J.; SUBRAMANIAN, A.; SCHREIBER, S. L.; WEISSLEDER, R. Perturbational profiling of nanomaterial biologic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.7387-92, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. v. 82, n. 2, p. 291-295,1997.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p.1-20, 2001.

STERN, S. T; MCNEIL, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. **Toxicology Sciences**. v.101, p. 4-21. 2008.

STONE, V.; JOHNSTON, H.; SCHINS, R. P. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 39, n. 7, p. 613-26, 2009.

VALLE, M. J. D. J.; OLIVEIRA, R. J. D.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. L.; NAVARRO, A. S. Toxicological evaluation of lactose and chitosan delivered by inhalation. **Journal of Biomaterials Sciences Polymer**, v.19, p. 387–397, 2008.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System. **BiolImpacts**, v. 1, p. 87-97, 2011.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, 2009.

VEGA-VILLA, K. R.; TAKEMOTO, J. K.; DAVIES, N. M. et al. “Clinical toxicities of nanocarrier systems”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 8, p. 929–938, 2008.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloid Surface A**, v. 375, p. 200-8, 2011.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. **Small**, v.6, p.12–21, 2010.

WANG, W.; ZHOU, S.; GUO, L.; ZHI, W.; LI, X.; WENG, J. Investigation of endocytosis and cytotoxicity of poly-d, l-lactide-poly(ethylene glycol) micro/nanoparticles in osteoblast cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 557-66, 2010.

WARHEIT, D. B.; LAURENCE, B. R.; REED, K. L.; ROACH, D. H.; REYNOLDS, G. A.; WEBB, T. R. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. **Toxicological Sciences**, v. 77, p.117-25, 2004.

WATTAMWAR, P. P.; HARDAS, S. S.; BUTTERFIELD, D. A.; ANDERSON, K. W.; DZIUBLA, T. D. Tuning of the pro-oxidant and antioxidant activity of trolox through the controlled release from biodegradable poly (trolox ester) polymers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 99A, p. 184–191, 2011.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer-- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-56, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Council for International Organizations of Medical Sciences. **International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects**. Geneva; 1993.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; BRANT, J.; HOTZE, M.; SEMPFF, J.; OBERLEY, T.; SIOUTAS, C.; YEH, J. I.; WIESNER, M. R.; NEL, A. E. Comparison of the abilities of


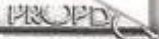
ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, v. 6, p.1794-807, 2006.

YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. K.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. **NanoToday**, v. 6, p. 585-607, 2011.

YOKEL, R. A.; MACPHAIL, R. C. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 6, p. 7, 2011.

YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Amphiphilic chitosan nanosphere: studies on formation, toxicity, and guest molecule incorporation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, n.5, p. 2687-96. 2008.

9.1 Comitê de ética

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRO-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética Na Utilização De Animais	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 18427
Título: Avaliação toxicológica in vivo de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

SOLANGE CRISTINA GARCIA - coordenador desde 01/06/2010
SILVIA STANISCUASKI GUTERRES - pesquisador desde 01/06/2010
ADRIANA RAFFIN POHLMANN - pesquisador desde 01/06/2010
MIRNA BAINY LEAL - pesquisador desde 01/06/2010
TERESA CRISTINA DALLA COSTA - pesquisador desde 01/06/2010
ANDREIA BUFFON - pesquisador desde 01/06/2010
Rachel Picada Bulcao - pesquisador desde 01/06/2010
GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO - Aluno de Graduação desde 01/06/2010
BRUNA GAUER - Aluno de Graduação desde 01/06/2010
Angela Maria Moro - Aluno de Doutorado desde 01/06/2010

Equipe Externa:

Paulo Zielinsky - pesquisador desde 01/06/2010
Mirian Salvador - pesquisador desde 01/06/2010
Eliane Dallegrave - pesquisador desde 01/06/2010

O mesmo foi aprovado pelo Comissão De Ética Na Utilização De Animais, em reunião realizada em 21/06/2010 - Sala de reuniões, no 6º andar do Prédio da Reitoria, Campus Central da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho nacional de Saúde.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 1 de Julho de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética



INSTITUTO DE CARDIOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Porto Alegre, 16 de agosto de 2010.

Pesquisadora
Raquel Picada Bulcão
Orientação
Prof. Dra. Solange Cristina Garcia
c/c
Divisão de Produção Científica
Unidade de Pesquisa
Sra. Maria Del Carmen Stefani
Nesta Instituição

Ref. Projeto de Pesquisa – UP nº 4482/10 encaminhado para apreciação e julgamento ao Comitê de Ética em Pesquisa do IC/FUC.

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto de Pesquisa “*Avaliação Toxicológica in vivo*” de *Nanocápsulas Poliméricas Biodegradáveis em Ratos*”.

Para atingir este objetivo serão realizados testes toxicológicos agudos, subcrônicos e crônicos, em que biomarcadores sanguíneos e urinários serão avaliados em ratos, estudando a função tecidual e o estresse oxidativo com avaliação de alguns marcadores. Além disto, será realizada uma avaliação de marcadores de dano cardíaco, marcadores de inflamação e imunológicos, bem como a realização do ensaio cometa para avaliação do dano ao DNA. Assim, estudos nesta linha podem embasar a avaliação da resposta tóxica e, conseqüentemente, levar ao estabelecimento de modelos preditivos para avaliação da toxicidade.

Parecer: Projeto Aprovado em 13 de agosto de 2010.

Dr. Ari Tadeu Lirio dos Santos
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
IC/FUC

9.2 Trabalhos referentes ao doutorado apresentados em congressos, simpósios, encontros

Bulcao, R. P. ; Bubols, G. B. ; Venturini, C. G. ; Nascimento, S. N. ; Sauer, E. ; Cassini, C. ; Salvador, M. ; Pohlmann, A. R. ; Guterres, S. S. ; Garcia, S. C. . Genotoxicity and lipid damage after acute administration of lipid-core nanocapsules in rats. In: **XXVII Reunião Anual da FeSBE**, 2012, Águas de Lindóia. XXVII Reunião Anual da FeSBE, **2012**.

Gauer, B. ; Bulcão, R. ; Durgante, J. ; Maciel, E. ; Sauer, E. ; Baierle, M. ; Zielinsky, P. ; Leal, M. ; Pohlmann, A. R. ; Guterres, S. S. ; Garcia, S. C. . Avaliação Da Hepatotoxicidade, Nefrotoxicidade E Peroxidação Lipídica Após Administração Intradérmica De Nanocápsulas De Núcleo Lipídico Em Ratos. **2012**. (Apresentação de Trabalho/Outra) **Salão de Iniciação Científica UFRGS**.

Gauer, B. ; Bulcão, R. ; Durgante, J. ; Sauer, E. ; Charao, M. ; Zielinsky, P. ; Pohlmann, A. R. ; Guterres, S. S. ; Garcia, S. C. . Avaliação Da Hepato E Nefrotoxicidade De Nanocápsulas De Núcleo Lipídico Após Administração Intradérmica Em Ratos. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso). In: **V Congresso Internacional de Bioanálises**, VIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, XII Semana Gaúcha de Biomedicina, 2012, Novo Hamburgo. Anais do V Congresso Internacional de Bioanálises, VIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, XII Semana Gaúcha de Biomedicina, **2012**.

Sauer, E. ; Bulcao, R. P. ; Guterres, S. S. ; Zielinsky, P. ; Garcia S. C. . Avaliação de Biomarcadores do Dano Oxidativo e Dano Tecidual em Tratamento Subcrônico Utilizando Nanocápsulas Poliméricas. In: **XVI Salão de Iniciação Científica do IC/FUC**, 2012, Porto Alegre. Anais do XVI Salão de Iniciação Científica do IC/FUC, **2012**.

Sauer, E. ; Bulcao, R. P. ; Goethel, G. ; Nascimento, S. ; Pohlmann, A. R. ; Zielinsky, P. ; Guterres, S. S. . Avaliação de Biomarcadores do Dano Oxidativo e Dano Tecidual Após Administração Intraperitoneal Subcrônica de Nanocápsulas Biodegradáveis. In: **V Congresso Internacional de Bioanálises**, VIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, XII Semana Gaúcha de Biomedicina, 2012, Novo Hamburgo. Anais do V Congresso Internacional de Bioanálises, VIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, XII Semana Gaúcha de Biomedicina, **2012**.

Bulcão, R.P., De Freitas, F.A., Dallegrave, E., Arbo, M.D., Zielinsky, P., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Garcia, S.C. Acute Toxicological Evaluation Of Lipid-Core Nanocapsules In: 47th Congress Of The European Societies Of Toxicology (Eurotox), Paris. **Toxicology Letters**. Elsevier, **2011**. V.205s. P.287 - 287

Bulcão, R.P., De Freitas, F.A., Venturini, C.D.G., Durgante, J., Guerreiro, G., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Garcia, S.C. Subchronic Toxicological Evaluation Of Lipid-Core Nanocapsules In: 47th Congress Of The European Societies Of Toxicology, Paris. **Toxicology Letters**. Elsevier, **2011**. V.205. P.S287 -

Guerreiro G, Bulcão, Rachel Picada, Freitas, F. A., Dallegrave, E., Baierle, M., Goethel, G., Charão, Mariele F, Moro, A. M., Brucker, Natália, Guterres, S. S., Garcia, Solange Cristina. Avaliação Da Toxicidade Aguda De Nanocápsulas In: XIX Jornadas De Jóvenes Investigadores, 2011, Ciudad Del Este. **XIX Jornadas De Jóvenes Investigadores**. , **2011**.

Bulcão, Rachel Picada, Freitas, F. A., Dallegrave, E., Arbo, Marcelo Dutra, Guerreiro G, Nascimento, S. N., Waetchter, F., Pohlmann, A. R, Guterres, S. S., Garcia, Solange Cristina Avaliação Da Toxicidade Aguda De Nanocápsulas Poliméricas Em Ratos. In: Xvii Congresso Brasileiro De Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto - Sp. **XVII Congresso Brasileiro De Toxicologia**. , **2011**.

Bulcão, Rachel Picada, Freitas, F. A., Dallegrave, E., Goethel, G., Maciel, E., Sauer, E., Durgante, J., Pohlmann, A. R, Guterres, S. S., Garcia, Solange Cristina Avaliação Da Toxicidade Subcrônica De Nanocápsulas Poliméricas Em Ratos. In: Xvii Congresso Brasileiro De Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto. **XVII Congresso Brasileiro De Toxicologia**. , **2011**.

Gauer, B., Bulcão, Rachel Picada, Freitas, F. A., Venturini, C. G., Maciel, E., Durgante, J., Sauer, E., Baierle, M., Zielinsky, P., Leal, Mirna Bairy, Pohlmann, A. R, Guterres, S. S., Garcia, Solange Cristina

Avaliação Toxicológica Subcrônica De Nanocápsulas Poliméricas Utilizadas Como Carreadoras De Fármacos Pela Via Intradérmica In: Iv Congresso Internacional De Bioanálises, 2011, Novo Hamburgo - Rs. **IV Congresso Internacional De Bioanálises. , 2011.**

Bulcão,RP ; Göethel, G. ; De Freitas, FA ; Dallegrave ; Venturini,C.G ; Maciel,E ; Sauer, S. ; Bubols,G. ; Waechter, F ; Nascimento, S. ; Arbo, M. ; Guterres, SS ; Garcia, SC . Toxicidade Aguda De Nanocápsulas Poliméricas Para Drug Delivery Pela Via Intradérmica Em Ratos: Um Estudo Piloto. In: Novo Hamburgo Rs. **IV Congresso Internacional De Bioanálises, VII Congresso Sul - Brasileiro De Biomedicina E XI Semana Gaúcha de Biomedicina, 2011.**

Bulcão, Rachel Picada, Freitas, F. A., Dallegrave, E., Venturini, C. G., Gauer, B., Durgante, J., Maciel, E., Baierle, M., Pohlmann, A. R, Guterres, S. S., Garcia, Solange Cristina Subchronic Toxicological Evaluation Of Lipid-Core Nanocapsules In Wistar Rats In: Iii Encontro Ppgcf/Ufrgs, 2011, Porto Alegre. **III Encontro PPGCF/Ufrgs. , 2011.**

Bulcão,RP ; De Freitas, FA ; Venturini,C.G ; Dallegrave ; Durgante,J ; Göethel, G. ; Waechter, F ; Baierle, M. ; Charao, M. ; Moro, A. M. ; Brucker, N. ; Pohlmann, AR ; Guterres, SS ; Garcia, SC . Avaliação Da Toxicidade Subcrônica De Nanocápsulas Poliméricas Carreadoras De Fármacos Pela Via Intraperitoneal. In: Porto Alegre - Rs. **Toxsul II Congresso Sul De Toxicologia Clínico Laboratorial, 2011.**

Bubols, G. B. ; Bulcao, R. P. ; Freitas, F. A. ; Dallegrave, E. ; Sauer, E. ; Gauer, B. ; Nascimento, S. N. ; Maciel, E. S. ; Leal, M. B. ; Pohlmann, A. R. ; Guterres, S. S. ; Garcia, S. C. . Toxicidade Aguda De Nanocápsulas Poliméricas Carreadoras De Fármacos Pela Via Intraperitoneal. In: **II Congresso Sul De Toxicologia Clínico-Laboratorial, 2011**, Porto Alegre

Bulcão,RP ; Dallegrave ; Charao, M. ; Göethel, G. ; Zielinsky, P. ; Leal, M. ; Pohlmann, AR ; Guterres, SS ; Garcia, SC . In Vivo Toxicological Evaluation Of Biodegradable Polymeric Nanocapsules. In: II Encontro Anual Do PPGCF Ufrgs, 2010, Porto Alegre. **II Encontro Anual Do PPGCF Ufrgs, 2010.**

9.3 Prêmios e destaques

2010 Destaque - Melhor pôster na área Toxicologia, II Encontro do PPGCF - UFRGS. In vivo toxicological evaluation of biodegradable polymeric nanocapsules. Rachel Bulcão, 28 e 29 de outubro de 2010. Bulcão, R.; Dallegrave, E.; Charão, M. F.; Goethel, G.; Zielinsky, P.; Leal, M.B.; Buffon, A.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S.S.; Garcia, S.C.

2011 Destaque - Melhor Pôster na área Farmacologia e Toxicologia, III Encontro do PPGCF - UFRGS. 2011 – Subchronic toxicological evaluation of lipid-core nanocapsules in Wistar rats. Rachel Bulcão, 24 e 25 de novembro de 2011, Bulcão R.P.; Freitas F.A.; Dallegrave E.; Venturini C.G.; Durgante J.; Maciel E.; Baierle M.; Leal M.B.; Pohlmann A.P.; Guterres S.S.; Garcia S.C.

2011 1º Lugar - Apresentação oral destaque, IV Congresso Internacional de Bioanálises - Feevale. 2011 Toxicidade aguda de nanocápsulas poliméricas para drug delivery pela via intradérmica em ratos: um estudo piloto. 24 a 26 de agosto de 2011. Goethel, G. ; Bulcão, Rachel Picada ; Freitas, F. A. ; Dallegrave, E. ; Maciel, E. ; Venturini, C. G. ; Sauer, E. ; Bubols, G. B. ; Waechter, F. ; Nascimento, S. N. ; Pohlmann, A. R ; Guterres, S. S. ; Garcia, Solange Cristina

2012 – Trabalho Elisa SIC, Avaliação de Biomarcadores do Dano Oxidativo e Dano Tecidual Em Tratamento Subcrônico Utilizando Nanocápsulas Poliméricas. Elisa Sauer, Rachel P. Bulcão, Sílvia S. Guterres, Paulo Zielinsky, Solange Cristina Garcia XVI Salão de Iniciação Científica do IC/FUC, 13-15 de Junho de 2012