

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Magno Maciel Magalhães

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* APÓS EXPOSIÇÃO ORAL A
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE, DE ACORDO COM AS DIRETRIZES
DO GUIA 420 DA OECD.

Rio de Janeiro

2018

Magno Maciel Magalhães

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* APÓS EXPOSIÇÃO ORAL A
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE, DE ACORDO COM AS DIRETRIZES
DO GUIA 420 DA OECD.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Fabio Coelho Amendoeira

Colaborador: Tiago Savignon Cardoso

Machado

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Magalhães, Magno Maciel

Avaliação da toxicidade aguda in vivo após exposição oral a nanopartículas de óxido de cobre, de acordo com as diretrizes do Guia 420 da OECD. / Magno Maciel Magalhães. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2018.

110 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientador: Dr. Fabio Coelho Amendoeira

1. Óxido de Cobre. 2. Nanopartículas. 3. Toxicidade. 4. Nanotoxicologia. I. Título

Magno Maciel Magalhães

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* APÓS EXPOSIÇÃO ORAL A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE, DE ACORDO COM AS DIRETRIZES DO GUIA 420 DA OECD.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 28 / 02 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Virginia Martins Carvalho (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Helvécio Vinícius Antunes Rocha (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos).

Fábio Coelho Amendoeira (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a aqueles que me deram a vida, educaram e têm importância inestimável no meu existir: minha mãe Ceíça e meu pai José. Sem a ajuda constante de vocês o caminho percorrido até aqui seria muito mais difícil, com certeza. Meu irmão Alex e cunhada Edlucy, que sempre me incentivaram nos momentos que precisei, deixo aqui um obrigado também. Meus sobrinhos, que ainda nem fazem ideia do que seja uma dissertação (mal sabem o que são provas de escolas), continuem sendo estudiosos assim. Sigam em frente e nunca desistam! O tio é chato e não tem paciência, mas ama vocês!

Minhas avós Hilda e Mariazinha (*in memoriam*), obrigado pelos incontáveis doces de banana, as horas de carinho, os quebra-cabeças montados, os papos e o amor que sempre dedicaram a mim. O restante da minha família, em especial minha madrinha Graça (não oficial, mas quem liga?), por compreenderem as ausências em momentos especiais. O restante dos tios, tias, primos e primas eu não vou citar nomes, porque eu sei que vou esquecer alguém e vai dar brigas. Vocês têm meu amor incondicional. Mesmo que tenhamos desentendimentos em certos momentos, sempre amarei vocês!

Não posso deixar de agradecer novamente à minha filhota, que todo santo dia, enquanto eu escrevia a dissertação desesperado com o prazo, se deitava embaixo da minha cadeira e ficava tirando seus cochilos enquanto ouvia o “tec tec” do meu teclado. Obrigado, Marie! Vc continua sendo a coisa peluda de quatro patas mais fofa desse mundo e sempre será!

Um obrigado especial aos meus amigos, a famosa "família que escolhi". Claro que são muitos para escrever aqui, mas alguns merecem destaque especial nesses últimos 2 anos. Mayara, por exemplo, já me atura há praticamente 13 anos. Se isso não é amizade de verdade, eu não sei o que é. E nossa, como ela me aturou reclamando do projeto, dos bichos, da escrita... Aliás, todos os amigos aturaram rs... Mas ela foi uma santa no quesito paciência! Beatriz, que não lembrou de mim na dissertação dela (não me ama, mas eu amo, fazer o que?), obrigado pela paciência também. E por Portugal! Sem aquela viagem, eu teria surtado. Iasmin e Ighor, que apesar de estarmos um pouco mais distantes ultimamente, por circunstâncias da vida, continuam sendo muito importantes, e sempre serão! Saudades diárias de vcs! Thamara, Thais, Clarissa, Isabella, Luiza, Mariana, Jessica e Gabi, minhas delicias farmacológicas: vocês não sumiram! Eu lembro que escrevi no TCC para não sumirem. Obrigado por ainda estarem aqui, ainda me aturarem e serem maravilhosas. E tomara que fiquem para sempre! Amigos: amo todos vocês!

Quero agradecer também aos meus queridos orientadores Dr. Fábio Coelho Amendoeira e Dr. Tiago Savignon Cardoso Machado. Eu sei que nem de longe eu fui o melhor orientando que alguém pode ter, mas obrigado pela paciência, pelas dicas, pelas estatísticas (sigo sem entender isso direito rs) e pelas horas gastas com a minha formação acadêmica. Serei eternamente grato!

Renata, Jussara e Thais: muito obrigado pelas ajudas com os animais do trabalho. E por ajudarem quando a Marie ficou doente pela primeira vez (pai de primeira viagem em pânico por uma mera diarreia que passou em um dia... quem nunca?). Melhores veterinárias!!!!

Aliás, obrigado a toda equipe do INCQS, especialmente do DFT. Melhor departamento!! Renata, Tiago, Thais e Clarice: partiu outback? Galera LabFar: obrigado pelas risadas. Impossível conviver com esse povo e ficar de mau humor. Vocês são fodas! Talita e Catia (não são DFT, mas são maravilhosas) obrigado pela amizade, paciência e carinho (sim Talita, vc é carinhosa, só que do seu jeito rs).

Pessoal da turma de pós em ViSa 2016, em especial Janine, Sibebe, Ana, Vanessa e Renata C.: quero minha cerveja. Vamos todos defender logo pra gente chapar o coco juntos! Saudades de vcs! Obrigado por tudo.

Um agradecimento mais que especial ao Dr. Helvécio Rocha (pela abertura das portas do seu laboratório para mim, e por aceitar fazer parte da banca avaliadora da dissertação), a Dra. Elan Cardozo (hooooooras vendo lâminas histológicas, tirando fotos e me ensinando a interpretar) e a Dra. Beatriz Patricio (mil e uma perturbações via whatsapp, até nos fins de semana) por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Sem a colaboração de vocês, ele não teria acontecido.

Por último, mas certamente importante, agradeço a Dra. Helena Zamith, pela revisão do trabalho e por aceitar ser a presidente da banca, Dra. Virginia Carvalho, por ensinar praticamente tudo que sei sobre toxicologia, pelas horas de papo e por estar na banca da minha dissertação, e as Dr.as. Giselle Holanda e Isabella Delgado por aceitarem o convite para serem as avaliadoras suplentes. As opiniões, sugestões, críticas e elogios de todos vocês são essenciais para mim. Sem críticas, não existe crescimento.

RESUMO

Nanopartículas (NPs) são conceituadas como partículas sólidas que geralmente, mas não obrigatoriamente, possuem entre 1 e 100 nm de tamanho. Trabalhos na literatura já demonstraram que estas podem ter toxicidade acima da encontrada no mesmo material confeccionado em outras escalas. As NPs de óxido de cobre (CuO-NPs) têm sido cada vez mais utilizadas em produtos de interesse humano, tais como revestimentos antimicrobianos, lubrificantes, plásticos, cosméticos, dentre outros. É possível encontrar estudos *in vivo* sobre a toxicidade destas NPs, mas somente por vias inalatória e intraperitoneal. O objetivo central deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda *in vivo* de CuO-NPs, após exposição por via oral, seguindo as diretrizes preconizadas no Guia 420 da OECD. Na análise do tamanho do diâmetro hidrodinâmico das CuO-NPs através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, obteve-se o valor médio de $166,9 \pm 2,54$ nm. Ao variarmos o pH do meio de suspensão, com a intenção de mimetizarmos *in vitro* o trato gastrointestinal humano, observou-se que as CuO-NPs solubilizam em meio ácido e aglomeram em meio básico. Para o ensaio de toxicidade aguda oral, foi realizada comparação entre as CuO-NPs e o mesmo material microparticulado. A maior parte dos sinais clínicos e parâmetros laboratoriais avaliados não apresentou resultados significativos. Somente os animais tratados com CuO-NPs na dose de 2000 mg.kg^{-1} apresentaram alterações nas fezes dos primeiros dias de estudo e na dosagem da enzima aspartato aminotransferase. Estes dados, juntamente com os achados histopatológicos observados, tais como binucleação de hepatócitos e megalocitose, podem sugerir a ocorrência de lesão hepática leve, mas que foi revertida ao longo dos 14 dias de observação. Com os resultados, sugere-se que as CuO-NPs não apresentam sinais conclusivos de toxicidade, quando administradas por via oral de forma aguda, na faixa de doses estudada – 50 a 2000 mg.kg^{-1} .

Palavras-chave: Óxido de Cobre. Nanopartículas. Toxicidade. Nanotoxicologia.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are conceptualized as solid particles that usually, but not necessarily, have between 1 and 100 nm in size. Studies in literature have already demonstrated that these may have higher toxicity than the same material made at other scales. Copper oxide NPs (CuO-NPs) have been increasingly used in products of human interest, such as antimicrobial coatings, lubricants, plastics, cosmetics, among others. *In vivo* studies on the toxicity of these NPs can be found, but only by inhalation and intraperitoneal routes. The main objective of this study was to evaluate *in vivo* acute toxicity of CuO-NPs after oral exposure, following the guidelines recommended in OECD Guide 420. In hydrodynamic diameter size analysis of CuO-NPs, made by dynamic light scattering technique, the average value of 166.9 ± 2.54 nm was obtained. By varying the pH of suspension medium, with the intention of mimic the human gastrointestinal tract *in vitro*, it was observed that the CuO-NPs solubilize in acid medium and agglomerate in a basic medium. For the acute oral toxicity test, CuO-NPs and the same microparticulate material were compared. Most of the clinical signs and laboratory parameters evaluated did not present significant results. Only animals treated with CuO-NPs at the dose of 2000 mg.kg⁻¹ presented changes in the faeces at first days of study and in enzyme aspartate aminotransferase dosage. These data, along with the observed histopathological findings, such as binucleation of hepatocytes and megalocytosis, may suggest the occurrence of mild hepatic injury but reversed over the 14 days of observation. With these results, it is suggested that the CuO-NPs do not present conclusive signs of toxicity when administered acutely orally in the studied dosing range – 50 to 2000 mg.kg⁻¹.

Key-words: Copper Oxide. Nanoparticles. Toxicity. Nanotoxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sonda para gavagem de ratos.....	50
Figura 2	Eletromicrografias de CuO-NPs.....	56
Figura 3	Eletromicrografias de CuO-MPs.....	57
Figura 4	Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs.....	73
Figura 5	Fotomicrografias (400x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs.....	74
Figura 6	Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs.....	75
Figura 7	Fotomicrografias (400x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs.....	76
Figura 8	Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs.....	78
Figura 9	Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs.....	79
Figura 10	Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs.....	80
Figura 11	Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs.....	81

Figura 12	Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs.....	82
Figura 13	Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs.....	83
Figura 14	Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs.....	84
Figura 15	Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição de tamanho das CuO-NPs analisadas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.....	55
Gráfico 2	Dispersão de tamanho em nm das CuO-NPs nos diferentes valores de pH estudados e na água ultrapura.....	59
Gráfico 3	Peso de ratos Wistar de sexo feminino, ao longo de 14 dias de observação após a administração oral em dose única de CuO-NPs.....	61
Gráfico 4	Peso de ratos Wistar de sexo feminino, ao longo de 14 dias de observação após a administração oral em dose única de CuO-MPs.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tamanho de partícula, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta de CuO-NPs, medidos em diferentes valores de pH.....	59
Tabela 2	Resultado da Avaliação dos Sinais Clínicos, em ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs e CuO-NPs.....	60
Tabela 3	Consumo diário de alimento por ratos Wistar de sexo feminino ao longo de 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs.....	63
Tabela 4	Consumo diário de alimento por ratos Wistar de sexo feminino ao longo de 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-MPs.....	64
Tabela 5	Avaliação hematológica de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	66
Tabela 6	Avaliação bioquímica de enzimas e proteínas de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	68
Tabela 7	Avaliação bioquímica de sais, glicose e colesterol de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	69
Tabela 8	Resultados anatomopatológicos do exame macroscópico em órgãos de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	70
Tabela 9	Peso absoluto de órgãos isolados de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	71
Tabela 10	Análise histopatológica do fígado de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	72
Tabela 11	Análise histopatológica dos rins de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs ou CuO-MPs.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Pareceres da WPMN sobre os testes preconizados pela OECD.....	21
Quadro 2	Composição dos meios de diferentes valores de pH utilizados.....	45
Quadro 3	Composição da ração utilizada de marca Nuvilab®.....	48
Quadro 4	Valores médios de pH do trato gastrointestinal de ratos.....	88
Quadro 5	Valores de referência para hemoglobina e plaquetas de ratos Wistar de sexo feminino do ICTB e de quatro outros biotérios brasileiros.....	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag-NPs	Nanopartículas de prata
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHE	Barreira hemato-encefálica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação
CK	Creatinina cinase
Cu-MPs	Micropartículas de cobre
Cu-NPs	Nanopartículas de cobre
CuO-MPs	Micropartículas de óxido de cobre
CuO-NPs	Nanopartículas de óxido de cobre
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
DL ₅₀	Dose letal 50%
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> - Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe ₂ O ₃ -NPs	Nanopartículas de óxido de ferro (III)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Hct	Avaliação do hematócrito
HE	Hematoxilina-Eosina
HGB	Dosagem de hemoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
ICP-MS	Espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 β
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ISNF	Instituto de Saúde de Nova Friburgo
ISO	Organização Internacional de Normalização
LCE	Líquido cérebro-espinhal
LDH	Lactato desidrogenase
LMPB	Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Biomédica
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NPs	Nanopartículas
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	Índice de polidispersão
Plaq	Plaquetas
RBC	Contagem de hemácias
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAL	Serviço de Animais de Laboratório
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
TiO ₂ -NPs	Nanopartículas de dióxido de titânio
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
UFF	Universidade Federal Fluminense
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
WBC	Contagem de leucócitos
WPMN	<i>Working Party on Manufactured Nanomaterials</i>
Zn-NPs	Nanopartículas de zinco
ZnO-NPs	Nanopartículas de óxido de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Características gerais de nanopartículas	18
1.2 Toxicologia de nanopartículas	20
1.2.1 Toxicologia de NPs metálicas	22
1.3 Propriedades e toxicidade do metal cobre	24
1.4 Óxido de cobre	27
1.4.1 Toxicidade ambiental das CuO-NPs	27
1.4.2 Toxicidade <i>in vitro</i> das CuO-NPs	32
1.4.3 Toxicidade <i>in vivo</i> das CuO-NPs	38
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 METODOLOGIA	44
4.1 Caracterização das CuO-NPs	44
4.1.1 Tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz	44
4.1.2 Morfologia e tamanho de partícula por microscopia eletrônica de transmissão	44
4.1.3 Tamanho das CuO-NPs em diferentes valores de pH do trato gastrointestinal	45
4.2 Teste de toxicidade aguda	46
4.2.1 Preparo das suspensões de CuO-NPs e CuO-MPs	46
4.2.2 Animais	47
4.2.3 Desenho Experimental	49
4.3 Parâmetros avaliados	50
4.3.1 Avaliação do ganho de peso diário	50
4.3.2 Avaliação da ingestão alimentar diária	51
4.3.3 Avaliação dos sinais clínicos selecionados	51
4.3.4 Avaliação hematológica e parâmetros bioquímicos	52
4.3.5 Avaliação anatomopatológica	52
4.3.6 Avaliação dos pesos dos órgãos isolados	53
4.3.7 Avaliação histopatológica de órgãos selecionados	53
4.4 Análise estatística	53
5 RESULTADOS	55

5.1 Caracterização das CuO-NPs	55
5.1.1 Análise do tamanho de partícula pela técnica de DLS	55
5.1.2 Morfologia e tamanho de partícula por microscopia eletrônica de transmissão	55
5.1.3 Tamanho das CuO-NPs em diferentes valores de pH do trato gastrointestinal	58
5.2 Avaliação dos sinais clínicos	60
5.3 Avaliação do ganho de peso diário	60
5.3 Avaliação da ingestão alimentar diária	62
5.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos	65
5.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	67
5.6 Avaliação anatomopatológica	70
5.7 Avaliação dos pesos dos órgãos isolados	71
5.8 Avaliação histopatológica dos órgãos selecionados	72
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	98
ANEXO 1 - FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO (FISPQ) DO ÓXIDO DE COBRE (II)	107
ANEXO 2 - FICHA DE ANÁLISE DE CuO DA MARCA SIGMA-ALDRICH	109
ANEXO 3 - CERTIFICADO REFERENTE A LICENÇA CEUA LW-37/17	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de nanopartículas

De acordo com o conceito utilizado pela Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization*, ISO), as nanopartículas (NPs) são partículas sólidas que geralmente, mas não obrigatoriamente, possuem entre 1 e 100 nm de tamanho (ISO, 2010).

Para a agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA), as NPs são aquelas em que pelo menos uma de suas dimensões se enquadra na faixa de 1 a 100 nm, ou produtos cuja atividade biológica e/ou propriedades físico-químicas estejam relacionados à escala nano (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

Segundo Fleishcher, Jahnel e Seitz, a limitação da escala nano variando entre 1 e 100 nm é importante para limitar quais produtos necessitam de análise regulatória diferenciada, bem como para facilitar o entendimento entre indústrias e órgãos regulatórios sobre este aspecto (FLEISCHER; JAHNEL; SEITZ, 2012).

As NPs podem ser utilizadas em diversas áreas, como materiais industriais, alimentos, têxtil, cosméticos, eletrônicos e energia. Além desses usos, também são empregadas na área médica, para fins diagnósticos, medicina regenerativa, implantes, vetorização de fármacos, dentre outros (ZHANG et al., 2011; PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Além do tamanho das NPs, outras características intrínsecas ao material são de extrema importância para suas propriedades. São elas: estrutura/formato, área de superfície, carga superficial (potencial Zeta), composição química, pureza, estabilidade, dentre outras. Diversas técnicas laboratoriais são úteis para elucidação destas propriedades, como por exemplo microscopia eletrônica de transmissão (MET), espalhamento dinâmico de luz (DLS), espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010).

A técnica do DLS tem como finalidade avaliar as dimensões das NPs em suspensão. Ela é capaz de fornecer dados sobre o movimento da partícula, por se

basear na análise das flutuações de intensidade da luz – fornecida por um LASER – espalhada em um determinado ângulo. Partículas em suspensão dificilmente se encontram paradas. Elas tendem a se mover, devido a colisões aleatórias entre elas e as moléculas de líquido ao seu redor. Esse movimento é o chamado “Browniano” (MALVERN, 2004; NOMURA et al., 2013).

Utilizando a equação de Stokes-Einstein é possível calcularmos o diâmetro hidrodinâmico das NPs, a partir do coeficiente de difusão translacional (D_t) obtido no DLS (NOMURA et al., 2013).

$$D_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T}$$

Equação 01: Equação de Stokes-Einstein, onde D_{ef} = diâmetro hidrodinâmico, k_B = constante de Boltzmann, T = temperatura, η = viscosidade do solvente e D_T = coeficiente de difusão translacional.

O potencial Zeta representa a medição do potencial eletro-cinético, sendo ele a diferença de potencial entre o meio dispersante e a camada estacionária ligada à partícula dispersa. Está diretamente ligado à estabilidade da dispersão, por indicar o grau de repulsão entre as NPs suspensas. Em geral, quanto maior é o potencial Zeta, mais estável é a suspensão. Quanto menor, maior a chance de ocorrer agregação das NPs (CARRANZA OROPEZA, 2011). A linha que separa as suspensões em estável ou instável é geralmente marcada em +30 mV ou -30 mV. Ou seja, suspensões com partículas tendo potenciais mais positivos que +30 mV e mais negativos que -30 mV são normalmente mais estáveis (MALVERN, 2004).

O índice de polidispersão (PDI) é a propriedade que fornece informação sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das NPs em suspensão. Quanto mais baixo é o valor encontrado, mais propensa é a suspensão de apresentar um sistema monodisperso, ou seja, onde as NPs se encontram com tamanhos similares (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

A morfologia das NPs é uma característica importante de ser estudada, uma vez que é capaz de influenciar na forma como estas interagem tanto entre elas quanto com células humanas, ou nos processos industriais nos quais são aplicadas. (CARRANZA OROPEZA, 2011).

Uma técnica muito utilizada é a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nesta, um feixe de elétrons é emitido sobre uma amostra ultra-fina, e, ao atravessá-

la, é gerada uma imagem causada pela interação dos elétrons transmitidos através da amostra. As imagens obtidas possuem resoluções maiores quando comparadas com as de um microscópio ótico, principalmente devido ao curto comprimento de onda dos elétrons, comparada com a luz visível. Esta técnica apresenta uma resolução tão precisa, que é possível obter um valor de tamanho de partícula seca bem próximo do real (CARRANZA OROPEZA, 2011).

1.2 Toxicologia de nanopartículas

Um ponto crítico no estudo de NPs é diferenciar a toxicologia destas para os materiais confeccionados na escala micrométrica ou macroscópica, uma vez que é possível encontrar trabalhos demonstrando que substâncias que não se apresentam como prejudiciais à saúde humana nestas escalas, quando produzidas na forma de nanopartículas, se tornam tóxicas, inclusive em doses menores que as usuais (DONALDSON et al., 2004; LAI et al., 2010).

Um aspecto relevante a ser levado em conta em ensaios de toxicologia de NPs é a dose a ser utilizada. Não se sabe ao certo se as doses preconizadas em guias atuais são as melhores a serem aplicadas, uma vez que não se tem muita informação sobre a toxicidade de NPs frente a gama de substâncias conhecidas atualmente. A dose é um dos parâmetros mais importantes a serem considerados nos estudos de toxicologia clássicos, já que substâncias benéficas em baixas concentrações podem se tornar potentes agentes intoxicantes em doses levemente mais elevadas, como a digoxina, por exemplo (BORZELLECA, 2000; OBERDORSTER, 2010; ELSAESSER; HOWARD, 2012).

Na nanotoxicologia, ao contrário da toxicologia clássica, que seleciona as doses baseando-se principalmente nas massas, o aspecto mais relevante no momento de seleção do doseamento parece ser a superfície de contato das NPs, que aumenta de acordo com a redução do tamanho das mesmas (FLEISCHER; JAHNEL; SEITZ, 2012).

Os testes toxicológicos clássicos mais utilizados para substâncias químicas em geral são os preconizados nos guias da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD). Em 2006 foi estabelecido um grupo chamado *Working Party on Manufactured Nanomaterials* (WPMN), responsável por verificar se os métodos de

avaliação propostos nestes guias eram ou não aplicáveis aos nanomateriais, sugerir melhorias, novas metodologias e adequações para que a toxicidade das NPs possa ser devidamente estudada. Os pareceres do WPMN encontram-se resumidos no Quadro 1 (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2009).

O guia 402 foi considerado inadequado devido aos critérios de análise patológica empregados, que foram julgados como “muito restritos”. Os testes 412 e 413 também foram considerados inadequados naquele momento, por falta de dados suficientes sobre efeitos neurotóxicos para embasar a aprovação dos mesmos. (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2009), mas em 2017 a OECD publicou uma revisão dos pareceres, indicando que estes se encontram aptos a serem utilizados em ensaios com NPs (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2017).

Quadro 1 - Pareceres do WPMN¹ sobre os testes preconizados pela OECD²

Guia	Título	Parecer
420	<i>Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure</i>	Adequado
423	<i>Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Classic Method</i>	Adequado
425	<i>Acute Oral Toxicity - Up-and-down Procedure</i>	Adequado
403	<i>Acute Inhalation Toxicity</i>	Adequado
402	<i>Acute Dermal Toxicity</i>	Inadequado
430	<i>In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test</i>	Adequado
431	<i>In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test</i>	Adequado
435	<i>In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion</i>	Adequado
404	<i>Acute Dermal Irritation/Corrosion</i>	Adequado
405	<i>Acute Eye Irritation/Corrosion</i>	Adequado
429	<i>Skin Sensitisation</i>	Adequado
406	<i>Skin Sensitisation</i>	Adequado
407	<i>Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity in Rodentes</i>	Adequado
409	<i>Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity in Non-Rodentes</i>	Adequado
412	<i>Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study</i>	Adequado
413	<i>Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study</i>	Adequado
471	<i>Bacterial Reversion Mutation Test</i>	Adequado
473	<i>In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test</i>	Adequado

476	<i>In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test</i>	Adequado
474	<i>Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test</i>	Adequado
475	<i>Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test</i>	Adequado
486	<i>Unscheduled DNA Synthesis Test With Mammalian Liver Cells In Vivo</i>	Adequado
421	<i>Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test</i>	Adequado
422	<i>Combined 407/409 with 421 Test</i>	Adequado
415	<i>One-Generation Reproduction Toxicity Study</i>	Adequado
416	<i>Two-Generation Reproduction Toxicity Study</i>	Adequado
414	<i>Prenatal Development Toxicity Study</i>	Adequado

¹Working Party on Manufactured Nanomaterials; ²Organisation for Economic Co-operation and Development; Fonte: (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2017).

1.2.1 Toxicologia de NPs metálicas

Os ensaios de toxicidade *in vitro* para NPs metálicas podem apresentar alguns interferentes, de acordo com Watson e colaboradores (2014). Podemos citar como exemplos, a interferência com a detecção de absorvância, devido a propriedades óticas das NPs; falhas em ensaios que utilizam bactérias, como o teste de Ames, devido à pouca ou nenhuma endocitose realizada por estes microrganismos; erros no teste de micronúcleo, devido à interação de reagentes como a citocalasina B, que pode inibir a endocitose, reduzindo a captação celular das NPs avaliadas; interação com fragmentação do DNA desprotegido no ensaio Cometa, levando a resultados falso-positivos. Assim, o desenvolvimento de novos testes para avaliar a toxicidade de NPs se faz necessário.

É possível encontrar na literatura muitos estudos envolvendo toxicidade de diversas NPs metálicas. Uma das mais estudadas são as NPs de dióxido de titânio (TiO₂-NPs), que são largamente utilizadas como pigmento branco em tintas, cremes dentais e indústria alimentícia, dentre outros. Além disso, são capazes de absorver e refletir radiação ultravioleta, servindo também como protetor solar (WANG et al., 2007). Apesar de não apresentarem toxicidade aguda, acumulam-se em determinados órgãos, tais como pulmões, fígado, baço e rins, devido à baixa solubilidade em água, que acarreta em reduzida capacidade de eliminação por via renal (WANG et al., 2007). Trabalhos demonstram que o TiO₂ microparticulado

acumula menos em camundongos e ratos que as NPs, e essas últimas possuem maior capacidade de migração dessas áreas para outros órgãos, além de induzirem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, resultando em respostas inflamatórias de intensidade média ou grave, fibrose renal (HUANG et al., 2015) e alterações nos níveis séricos de proteínas hepáticas (WANG et al., 2007), dentre outros efeitos deletérios encontrados na literatura.

Além destes efeitos, as TiO₂-NPs apresentam toxicidade relevante quando em contato com células do sistema nervoso. Estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, já demonstraram aumento em apoptose, inibição da proliferação celular, alterações morfológicas, produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre outros (CZAJKA et al., 2015). Danos na membrana celular de neurônios e células da glia foram observados *in vitro*, quando baixas doses de TiO₂-NPs foram adicionadas no meio de cultivo. Também foi observada diminuição da taxa de proliferação após exposição aguda ou prolongada (COCCINI et al., 2015).

Camundongos expostos cronicamente por via intragástrica com TiO₂-NPs apresentaram níveis aumentados de caspases 3 e 9, Citocromo C e produção de ROS, todas relacionadas a um estado pró-apoptótico, assim como diminuição da molécula anti-apoptótica Bcl-2, no hipocampo (HU et al., 2011). Resultados similares foram observados em ratas grávidas administradas com TiO₂-NPs pela mesma via. Foi constatada a redução na proliferação celular no hipocampo, além de *déficits* na memória e aprendizagem (MOHAMMADIPOUR; FAZEL; HAGHIR, 2014).

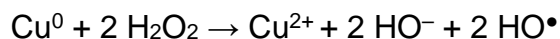
Nanopartículas de Zinco (Zn-NPs) são utilizadas em medicina diagnóstica, protetores solares, cosméticos, proteção ambiental e aditivo metalúrgico, dentre outros (COLVIN, 2003). A ingestão diária recomendada de zinco é de 0,3 mg/kg/dia e exposição a níveis superiores a 1 mg/kg/dia costumam levar a distúrbios gastrointestinais, tais como diarreia, náuseas, vômito e cólicas abdominais (U.S Department of Health and Human Services, 2003). Em um estudo comparando a toxicidade de Zn-NPs com Zn microparticulado, ambas administradas por via oral, em dose de 5 mg/kg/dia, observou-se que, no caso das NPs, todos os animais testados demonstraram letargia, anorexia, vômitos e diarreia, enquanto os tratados com micropartículas não apresentavam sintomas. Percebeu-se também que as Zn-NPs se acumularam no intestino dos animais, obstruindo-os. Porém, para ambos os tamanhos de partícula, os animais apresentaram sinais de inflamação gastrointestinal em exames histológicos (WANG et al., 2005).

1.3 Propriedades e toxicidade do metal cobre

O metal cobre (Cu), além de ser parte integrante de diversas proteínas, é também cofator em diversas reações enzimáticas (COUSINS, 1994). Tem ainda participação na respiração aeróbica e está relacionado à progressão tumoral (KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008), sendo necessário para o crescimento e desenvolvimento de vários tecidos. Além disso, está envolvido nos sistemas de defesa do corpo humano, maturação de células sanguíneas, transporte de ferro, metabolismo de colesterol e glicose e desenvolvimento cerebral (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996; OLIVARES; UAUY, 1996; ZATTA, 2007).

Os limites de ingestão de cobre diária vão de 900 µg a 10 mg por dia. Quando ultrapassado esse limite superior, efeitos tóxicos tais como desordens gastrointestinais e dano hepático podem ser observados (INSTITUTE OF MEDICINE, 2003).

Porém, na década de 80, foi demonstrado que o elemento cobre está diretamente ligado a geração da doença de Wilson. Nessa patologia hereditária recessiva, ocorre uma falha na excreção biliar do cobre, levando ao seu acúmulo em órgãos como fígado e cérebro, particularmente no núcleo lenticular do gânglio basal, o que leva a degeneração lenticular progressiva, gerando distúrbios neurológicos (SCHEINBERG; STERNLIEB, 1996). Uma possível explicação para a toxicidade do metal cobre é sua capacidade de atuar como agente oxidante, podendo desenvolver reações "tipo Fenton", como demonstrado na equação abaixo, ao entrar em contato com água oxigenada (H₂O₂), gerando radicais livres, que são ROS, sendo danosos a células e tecidos (LINDER, 2001).



Equação 02: Equação "tipo Fenton" do cobre, com geração de ROS (HO[•])

Pesquisadores da China utilizaram camundongos de ambos os sexos em um estudo de toxicidade aguda, com administração por via oral, de NPs de cobre metálico (Cu-NPs) (CHEN et al., 2006). Para isso, eles seguiram o guia 425 da OECD, que preconiza um delineamento do tipo *up and down*, ou seja: um primeiro animal recebe uma dose abaixo da dose letal esperada – baseado em achados *in vitro* ou outros ensaios prévios *in vivo* – e, caso este sobreviva, o próximo irá receber uma dose maior

que a primeira. Caso venha a óbito, o terceiro receberá uma menor. E assim sucessivamente, até que se atinja a dose máxima de 5000 mg.kg^{-1} sem mortes, ou a maior dose possível onde não ocorram óbitos. Os animais sobreviventes devem ser acompanhados durante 14 dias, para observação de sinais tóxicos e posterior eutanásia seguida de exame anatomo-histopatológico (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2008).

Os autores deste trabalho realizaram ensaios de comparação com micropartículas (Cu-MPs) e íons de cobre e relataram que todos os animais tratados com Cu-NPs e Cu^{2+} apresentaram sinais de toxicidade gastrointestinal, com redução da apetência e diarreia. Já os camundongos que receberam Cu-MPs, não apresentaram sintomas toxicológicos. As doses utilizadas neste ensaio foram nas faixas de 108 a 1080 mg.kg^{-1} para as Cu-NPs, 500 a 5000 mg.kg^{-1} para as Cu-MPs e 24 a 237 mg.kg^{-1} para os íons Cu^{2+} . Ao fim dos 14 dias de observação, no exame anatomopatológico, foram observadas alterações morfológicas de alguns órgãos, tais como escurecimento e aumento dos rins e fígado, e atrofia e alteração de coloração do baço (CHEN et al., 2006).

No exame histopatológico, também foram observadas alterações nestes três órgãos dos animais expostos às NPs e íons de cobre. Os autores encontraram necrobiose das células epiteliais de túbulos proximais, glomérulos encolhidos – sinal de glomerulonefrite –, presença de líquido proteico com deposição de corante roxo nos túbulos, esteatose próxima aos vasos centrais hepáticos, encolhimento das unidades esplênicas e fibrose no interstício do baço (CHEN et al., 2006).

Utilizando o *software* AOT425, os pesquisadores constataram que a dose letal 50% (DL_{50}) foi de 413 mg.kg^{-1} para as Cu-NPs e 110 mg.kg^{-1} para os íons, classificando-os como “moderadamente tóxicos”, ou classe 3 da escala de Hodge e Sterner. Já a DL_{50} calculada para as Cu-MPs foi superior a 5000 mg.kg^{-1} , sendo classificadas como “praticamente atóxicas”, ou classe 5 da escala (CHEN et al., 2006).

Uma pesquisa realizada na Coreia do Sul também estudou a toxicidade das Cu-NPs por via oral, porém, utilizou os guias 420 e 423 da OECD. Nestes, temos o delineamento de estudos com doses fixas em 5, 50, 300 e 2000 mg.kg^{-1} . Em ambos, deve-se começar com a dose abaixo da esperada para efeitos tóxicos, caso se tenha essa estimativa. Quando esta informação ainda não está disponível, inicia-se com a dose de 5 mg.kg^{-1} , com acréscimos sucessivos, até observar o desfecho estudado. A diferença entre os dois guias está no ponto de término do ensaio, uma vez que, no

guia 420, o desfecho utilizado é “ocorrência de sinais de toxicidade” (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2001a), enquanto para o guia 423 é a morte de 1 animal (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2001b). No trabalho, pesquisadores utilizaram ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos, com 8 semanas de vida, e testaram tanto as Cu-NPs quanto íons Cu^{2+} . As doses utilizadas neste ensaio foram nas faixas de 312 a 2500 mg.kg^{-1} para as Cu-NPs e 156 a 1250 mg.kg^{-1} para os íons Cu^{2+} . Foram realizados ensaios de toxicidade e também de cinética de absorção e excreção (KIM et al., 2016).

A cinética foi estudada através de análise de ICP-MS no sangue de animais que foram eutanasiados nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, uma, duas e quatro semanas após a administração oral das substâncias testadas. Os ratos tratados com as Cu-NPs apresentaram níveis de cobre sanguíneo elevados ao longo das quatro semanas, com pico de intensidade no tempo de 48 horas. Já para os que receberam Cu^{2+} , o pico foi no tempo de 12 horas, e a redução do nível sanguíneo de cobre foi mais rápida, já estando bastante reduzida em uma semana (KIM et al., 2016).

As DL_{50} calculadas ficaram em 570 mg.kg^{-1} para o Cu^{2+} e 2400 mg.kg^{-1} para as Cu-NPs. Os efeitos tóxicos encontrados no estudo incluíram diminuição no ganho de peso, diarreia, hematúria e piloereção, e começaram a ocorrer na dose de 2000 mg.kg^{-1} para as Cu-NPs e de 300 mg.kg^{-1} no caso dos íons (KIM et al., 2016).

Foram observadas alterações histopatológicas no fígado, rins e baço dos animais tratados com ambas as substâncias, nas mesmas concentrações descritas acima. Estas incluíram infiltração de células inflamatórias nos três órgãos, debris celulares nos túbulos renais, dilatação tubular, atrofia dos glomérulos e células esplênicas multinucleadas. Em ensaio de bioquímica sanguínea, os pesquisadores obtiveram como resultados, valores elevados das aminotransferases, ureia, proteínas totais e níveis reduzidos de cloro, sódio e da enzima lactato desidrogenase LDH (KIM et al., 2016).

Além dos ensaios *in vivo*, os autores realizaram também experimentos sobre a solubilidade das Cu-NPs em diferentes valores de pH – 6,5 (veículo de administração); 1,5 (pH gástrico); 7,8 (pH intestinal) – e notou-se que, no pH ácido, as Cu-NPs dissolveram quase completamente, e tanto em pH neutro, quanto básico, tenderam a agregar, formando partículas de aproximadamente 516 e 335 nm de diâmetro hidrodinâmico, respectivamente. Na análise por MET, as Cu-NPs secas apresentavam cerca de 30 nm (KIM et al., 2016).

Os autores concluíram o estudo sugerindo que as NPs não absorvidas foram excretadas nos primeiros dias nas fezes dos animais. As Cu-NPs, apesar de apresentarem acúmulo tecidual maior que os íons, devido ao maior tempo de eliminação encontrado no ensaio de cinética, se mostraram menos tóxicas e menos letais que o íon Cu^{2+} (KIM et al., 2016).

1.4 Óxido de cobre

De acordo com a ficha de informações de segurança de produto químico (FISPQ) anexada a esse trabalho (anexo 1), o CuO é considerado perigoso, apresentando perigo relacionado a sua ingestão, especialmente por ser hepatotóxico e nefrotóxico. Ainda causa irritação na pele, olhos e trato respiratório. É descrito como um pó preto-amarronzado, inodoro, com massa molecular de $79,55 \text{ g.mol}^{-1}$, densidade de $6,32 \text{ g.dL}^{-1}$ e ponto de fusão 1026°C .

As NPs de óxido de cobre (CuO-NPs), que são o foco do presente trabalho, têm sido cada vez mais utilizadas em produtos de interesse humano, tais como revestimentos antimicrobianos, lubrificantes, plásticos, cosméticos, empregadas como catalisadoras de reações químicas, dispositivos eletrônicos, dentre outros (BAEK; AN, 2011) .

1.4.1 Toxicidade ambiental das CuO-NPs

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos envolvendo testes toxicológicos das CuO-NPs em relação ao meio ambiente, especialmente relacionados ao ambiente aquático, principalmente por conta do despejo de efluentes de indústrias em rios, gerando contaminação dos ecossistemas ali presentes. Existem ensaios de toxicidade envolvendo algas (ARUOJA et al., 2009), peixes (TUNÇSOY et al., 2017), pequenos crustáceos (WU et al., 2017; ROTINI et al., 2017) e até mesmo bactérias ambientais (ROTINI et al., 2018) .

Pesquisadores da Estônia utilizaram culturas laboratoriais de *Pseudokirchneriella subcapitata*, uma espécie de alga que normalmente habita águas limpas, sendo ela um marcador reconhecido internacionalmente para esse tipo de ambiente. Para execução do trabalho, os autores seguiram um guia da OECD, que versa sobre a inibição do crescimento de algas. As algas foram incubadas com as

CuO-NPs a 100 mg.L^{-1} durante 72 horas. Após esse período, observou-se que, quanto maior a concentração de CuO-NPs utilizada, maior era a inibição do crescimento das algas. Neste estudo, eles utilizaram também o cobre metálico como controle, e perceberam que as CuO-NPs inibiram mais o crescimento das algas do que o Cu^0 (ARUOJA et al., 2009).

Em trabalho utilizando peixes de água fresca tropical, com alta tolerância a alterações ambientais como temperatura e salinidade, da espécie *Oreochromis niloticus*, pesquisadores dispersaram CuO-NPs a 100 mg.L^{-1} em água mineral e, posteriormente, colocaram nela os peixes que, por sua vez, já se encontravam devidamente aclimatados ao ambiente laboratorial. Não ocorreu mortalidade durante os 15 dias de observação do estudo. Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos e analisados em espectrofotômetro de emissão ótica para quantificação do metal cobre. Então, observou-se acúmulo de cobre nas guelras e no fígado. Uma vez que as CuO-NPs são capazes de gerar ROS, os autores concluem o trabalho sugerindo que esse acúmulo pode vir a ser prejudicial ao animal, devido a chance de levar à uma possível desnaturação lipídica e proteica (TUNÇSOY et al., 2017).

Em um ensaio sobre a toxicidade das CuO-NPs, frente aos crustáceos *Daphnia magna*, estudou-se diferentes formas de exposição, utilizando em primeiro momento uma apresentação direta das NPs aos animais, e posteriormente, com outro grupo de crustáceos, foi oferecida administração indireta, através de algas contendo CuO-NPs aderidas, que foram utilizadas como alimento. Em ambos os casos, a dose de Cu nos animais foi realizada por espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente nos dias 4, 9 e 14, após as exposições. Apesar das concentrações internas de Cu encontradas serem elevadas em ambos os casos, a dinâmica ocorreu de formas diferentes. No caso das CuO-NPs ingeridas na alimentação, o pico da concentração máxima encontrada foi no 9º dia, e já havia decaído drasticamente no dia 14. Para a apresentação direta, a concentração continuou a subir ao longo dos dias, com o pico de concentração máxima no 14º dia. Curiosamente, as concentrações no último dia do estudo se encontravam próximas, indicando que parte do cobre consumido na alimentação foi excretado, mas um pouco foi retido pelos animais, provavelmente atingindo um nível ótimo de Cu interno, similar ao máximo absorvido de forma direta (WU et al., 2017).

Os pesquisadores também coletaram as diversas carapaças dos crustáceos – que são trocadas a cada 2 dias –, analisaram o conteúdo de cobre nestas, e notaram

que a dose do metal acompanhava o decaimento da concentração interna, sugerindo que um dos mecanismos de excreção de cobre, nesses animais, é através da troca de carapaça (WU et al., 2017).

No grupo exposto diretamente, notou-se ainda que o aumento de tamanho do corpo dos animais ocorreu de forma mais lenta, e a quantidade de cistos depositados pelas fêmeas foi menor que no grupo alimentado com as CuO-NPs e no controle. Com isso, os autores concluíram que a exposição direta a CuO-NPs pode impactar a reprodução dos *D. magna*, além de retardar seu crescimento (WU et al., 2017).

Um grupo de pesquisadores da Itália realizou diversos ensaios sobre a ecotoxicidade das CuO-NPs, utilizando tanto animais, especialmente crustáceos, quanto bactérias encontradas no ambiente aquático (ROTINI et al., 2017, ROTINI et al., 2018).

Foram utilizadas quatro espécies diferentes de animais marinhos, sendo elas: a microscópica rotífera *Brachionus plicatilis*, o camarão *Artemia franciscana*, o copépodo *Tigriopus fulvus* e o ouriço marinho *Paracentrotus lividus*. Os testes tinham como objetivo verificar a ação letal das CuO-NPs (30 nm) frente a esses pequenos animais de ambiente aquático. Larvas dos crustáceos e o esperma do ouriço foram incubados com concentrações variadas de CuO-NPs (10, 20, 40, 80 e 160 mg.L⁻¹) e de Cu²⁺ (0,625, 1,25, 2,5, 5 e 10 mg.L⁻¹). Posteriormente, foi verificada a sobrevivência das larvas e o esperma foi colocado em contato com ovos não fertilizados da mesma espécie, para averiguar a capacidade de fertilização. A toxicidade dos íons foi mais proeminente que a das CuO-NPs, para os quatro organismos, e levou à morte de todas as larvas de *T. fulvus*. Para as CuO-NPs, as doses letais foram cerca de cem vezes maiores (DL₅₀ Cu²⁺ = 0,12 mg.L⁻¹; DL₅₀ CuO-NPs = 12,35 mg.L⁻¹). Porém, ao fim do estudo, mediu-se novamente o tamanho das NPs presentes nos meios de incubação e constatou-se que ocorreu agregação das mesmas, levando a um possível viés, por não se saber precisamente em que momento se deu a agregação – as CuO-NPs passaram de 30 nm para 500 nm (ROTINI et al., 2018).

Em outro estudo, os pesquisadores utilizaram a bactéria marinha *Vibrio anguillarum* para estudar a ecotoxicidade das CuO-NPs de 30 nm nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg.L⁻¹, CuO-MPs (10, 20, 40, e 80 mg.L⁻¹) e Cu²⁺ (0,625, 1,25, 2,5, e 5 mg.L⁻¹). Nesse ensaio, os autores variaram a salinidade do meio, para estudar se este fator ambiental estava associado ao aumento ou redução de efeitos tóxicos causados pelo cobre. Primeiramente as bactérias foram incubadas em meios com

diferentes concentrações de sal marinho e então adicionou-se as substâncias a serem estudadas. Após 48 horas, as amostras foram plaqueadas, para verificar a formação de colônias. Tanto para as CuO-NPs quanto para a forma iônica, o aumento da salinidade reduziu a toxicidade apresentada, levando a maior formação de colônias. Porém, no caso das CuO-MPs, o resultado foi inverso, reduzindo a viabilidade dos microrganismos com a elevação da concentração de sal (ROTINI et al., 2017).

Ao verificarem o tamanho das NPs nestas soluções salinas de incubação, os autores perceberam que a elevação da concentração de sal acarretou em aglomeração, diminuindo a superfície de contato reativa, provavelmente sendo este o motivo pelo qual a toxicidade foi reduzida. No caso dos íons Cu^{2+} , como eles tiveram que competir com outros íons provenientes do sal, os pesquisadores concluíram que estes penetraram menos nas células, causando menos efeito tóxico. Já as CuO-MPs não sofreram alterações com o aumento da salinidade e por isso se apresentaram tóxicas de forma concentração-depedente. Não foram observadas alterações morfológicas, por microscopias de transmissão e de varredura, nas bactérias estudadas. Os pesquisadores concluíram o trabalho sugerindo que, em ambientes marinhos, as CuO-NPs causam menos danos que em rios e lagos de água doce, uma vez que o aumento da salinidade leva a redução de seu poder tóxico (ROTINI et al., 2017)

Um grupo de pesquisadores da Universidade de Roskilde, na Dinamarca, publicou uma série de trabalhos sobre a ecotoxicidade das CuO-NPs em ambiente aquático, utilizando sujeitos distintos para demonstrar como estas nanopartículas podem ser prejudiciais quando desprezadas em rios e lagos (THIT; SELCK; BJERREGAARD, 2013, 2015; THIT et al., 2016, 2017).

No primeiro ensaio publicado, utilizou-se células epiteliais A6, originárias de túbulo distal de rim de sapo da espécie *Xenopus laevis*, adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC). O ensaio realizado foi de citotoxicidade com visualização microscópica, em busca de alterações na morfologia celular após o tratamento com as CuO-NPs (6 nm) a 200 μM . Testou-se ainda íons Cu^{2+} na mesma concentração frente a mesma cultura de células A6 e o resultado obtido foi a redução da proliferação celular em ambos os casos, quando comparado com o controle. Também foi observada taxa elevada de morte celular, com o surgimento de muitos *debris* nas culturas testadas com as duas formas de cobre. Utilizando citometria de fluxo, demonstrou-se por fim que, apesar do aumento na taxa de morte, as células que

sobreviveram não tiveram seu ciclo celular alterado, estando tanto controle quanto tratadas nos mesmos estágios de divisão ao mesmo tempo (THIT; SELCK; BJERREGAARD, 2013).

No trabalho seguinte, ainda utilizando as células A6, além de determinarem que a quantidade de células mortas nas culturas tratadas com as CuO-NPs (6 nm) a 200 μM era superior ao controle, os pesquisadores também analisaram a quantidade de ROS formado no interior destas, utilizando a sonda fluorogênica diclorofluoresceína diacetato DCFH-DA, que emite fluorescência quando é oxidada pelas ROS. Os autores encontraram então que a produção de ROS se encontrava bastante elevada, em relação ao controle. Por conta deste resultado, eles realizaram um ensaio Cometa para verificar danos ao material genético, observando que este não se encontrava mais deteriorado que o controle. Com isso, concluiu-se que, apesar da taxa de morte celular ser mais elevada, assim como a produção de ROS, o material genético das células A6 não estava sendo o alvo da degradação causada pelas CuO-NPs (THIT; SELCK; BJERREGAARD, 2015).

Recentemente, o grupo estudou a toxicidade das CuO-NPs (6 nm) na faixa de 10 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ frente ao crustáceo *Daphnia magna* sob diferentes condições de teste. Além das NPs, utilizou-se ainda Cu^{2+} na faixa de 1 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e Cu^0 na faixa de 10 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, variando o pH do meio, testando em 7,8 e também em 6,5. Dentre as formas testadas, a espécie de cobre que causou maior efeito deletério foi o Cu^{2+} , seguido pelas CuO-NPs e por último o Cu^0 . No pH 7,8, foram observados menos sinais de toxicidade em geral, quando comparado com o pH 6,5, demonstrando assim que, em águas levemente mais alcalinas, o efeito tóxico do cobre pode ser menos agressivo a esta espécie animal (THIT et al., 2016).

Por fim, em seu trabalho mais recente, Thit e colaboradores (2017) utilizaram a espécie *Danio rerio*, popularmente conhecida como *zebra fish*, para estudar os possíveis efeitos tóxicos de CuO-NPs (6 nm) e de íons Cu^{2+} de diferentes formas. Em um primeiro momento, os pesquisadores realizaram testes de citotoxicidade utilizando uma linhagem celular de hepatocarcinoma ictíaco, e estudaram também a produção de ROS intracelular, utilizando uma sonda fluorogênica, que emite fluorescência ao sofrer oxidação. Para estes ensaios foram utilizadas as concentrações de 2, 10, 50, 100 e 200 μM . Nesse caso, notou-se que, para ambas as formas de cobre estudadas, algumas células desprenderam-se da placa de crescimento, e apresentaram formato diferente aos da cultura controle. Com o passar dos dias, mesmo após a remoção do

cobre do meio extracelular, este efeito se acentuou, indicando que o dano causado às células leva algum tempo para ser remediado. Demonstrou-se também que o íon cobre levou a um aumento três vezes maior na produção de ROS em todas as concentrações estudadas, quando comparado com as CuO-NPs, que também causaram aumento na produção, em relação aos controles (THIT et al., 2017).

Em seguida, efetuou-se o teste de toxicidade do embrião de *zebra fish*, utilizando embriões colhidos cerca de 3 horas após a fertilização e concentrações de 0,1, 0,5, 2, 10, 50 e 200 μM . Neste ensaio constatou-se que não ocorreram mortalidades 24 horas após a administração de CuO-NPs ou de Cu^{2+} , e que os embriões que nasceram não apresentaram malformações. Por fim, foram realizados testes sobre a locomoção de peixes com quatro dias de vida, utilizando um programa que quantifica a velocidade e a distância nadada, ao longo do dia, pelos peixes do aquário. 24 horas após exposição aos materiais, os peixes tratados com ambas as substâncias apresentaram menor taxa de mobilidade em relação ao controle, mas que no tempo de 48 horas eles se encontravam todos iguais. Com isso, chegaram à conclusão que, em casos de exposição única ao cobre, os peixes podem sofrer alguma toxicidade, mas de forma transitória e logo voltam ao estado normal de movimentação (THIT et al., 2017).

1.4.2 Toxicidade *in vitro* das CuO-NPs.

Um estudo utilizando bactérias – *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* – demonstrou que, ao incubá-las com CuO-NPs de 30 nm, na concentração de 125 mg.L^{-1} , a formação de colônias foi reduzida ou totalmente eliminada, demonstrando assim o poder antimicrobiano dessas NPs. Nesse mesmo estudo, além de verificar a toxicidade das CuO-NPs frente a esses microrganismos, os pesquisadores também estudaram a influência de íons de cobre, e concluíram que as CuO-NPs foram mais eficientes na redução de formação de colônias que os Cu^{2+} (BAEK; AN, 2011).

Em um ensaio de 2008, pesquisadores utilizaram neurônios do hipocampo extraídos do cérebro de ratos de sete a oito dias de vida. Estas células foram mantidas em líquido cérebro-espinhal (LCE) artificial até serem utilizadas. O objetivo central deste trabalho era verificar a influência das CuO-NPs em canais de potássio voltagem dependentes. Notou-se que as CuO-NPs não alteraram a ativação nem a inativação

do canal estudado, mas que estas tinham a capacidade de interagir com canais de sódio (XU et al., 2009).

Em 2011, em um trabalho realizado na China, pesquisadores removeram os cérebros de ratos Wistar machos, confeccionaram fatias de 400 μm de espessura, contendo o hipocampo inteiro e incubaram em LCE artificial. Depois de uma hora de incubação, uma suspensão de CuO-NPs foi adicionada ao meio extracelular, na concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após cinco minutos, mediu-se a voltagem da corrente de sódio nos neurônios hipocampais e constatou-se que as CuO-NPs foram capazes de inibir a amplitude da corrente e aumentar o tempo de geração do potencial de ação, corroborando o trabalho de Xu e colaboradores (2009), ao comprovarem a ação das CuO-NPs sobre os canais de sódio do hipocampo (LIU et al., 2011).

Em 2014, Mancuso e Cao demonstraram em um estudo que as CuO-NPs possuem maior capacidade tóxica que micropartículas de óxido de cobre (partículas contendo entre 10 e 100 μm) frente a culturas de células tronco mesenquimais humanas. Nesse ensaio, os autores foram capazes de calcular a concentração inibitória 50% (IC_{50}) para ambos os materiais, encontrando os valores de $\text{IC}_{50} 2,5 \pm 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para as CuO-NPs e $\text{IC}_{50} 72,13 \pm 16,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para as CuO-MPs. Concluiu-se então que, devido à maior área de superfície das NPs, existe a chance de as reações redox serem facilitadas no meio intracelular, levando a formação de ROS e degradação celular (MANCUSO; CAO, 2014).

Tendo em mente que algumas NPs conseguem ultrapassar a BHE e chegar ao cérebro, e sabendo que os astrócitos se localizam entre as células do endotélio vascular e os neurônios cerebrais, um grupo de pesquisadores da Universidade de Bremen, na Alemanha, estudou a toxicidade das CuO-NPs nas concentrações de 10, 100 e 1000 μM frente a culturas deste tipo celular. Nesse estudo, as células foram incubadas juntamente com as CuO-NPs durante três horas e subsequentemente a viabilidade celular foi verificada através da quantificação da atividade da enzima lactato desidrogenase e do teste de permeabilidade membranar a iodeto de propídio, um intercalante de DNA incapaz de permear células cuja membrana se encontra íntegra. Em ambos os ensaios se notou que a viabilidade celular foi comprometida de forma concentração dependente. Percebeu-se também que as CuO-NPs foram capazes de penetrar nos astrócitos, e alguns apresentavam acúmulos das NPs em seus citoplasmas. Investigou-se então a formação de ROS e determinaram que, nas culturas tratadas com as NPs, havia uma marcação intensa para ROS na microscopia,

demonstrando que essas células produziram mais espécies reativas que as utilizadas como controle (BULCKE; THIEL; DRINGEN, 2013).

Dois anos depois, o mesmo grupo de pesquisadores publicou a continuação do trabalho utilizando a cultura de astrócitos. Nesse novo estudo eles foram capazes de demonstrar que, ao adicionarem as CuO-NPs no meio de cultivo, o fluxo glicolítico foi estimulado – entrada de glicose na célula com saída de lactato –, e ocorreu um aumento no conteúdo celular de glutathione, um agente antioxidante, nessas células. Além disso, eles observaram também que parte da glutathione produzida foi excretada pelas células para o meio extracelular. Baseados nos resultados descritos, os pesquisadores concluíram que, apesar de ser responsável pelo aumento na produção de ROS, as CuO-NPs também auxiliam na produção de antioxidantes, que agirão não só na célula afetada como também nas células vizinhas, como forma de contenção aos possíveis danos que seriam causados em caso de intoxicação por CuO (BULCKE; DRINGEN, 2015).

Um trabalho da Universidade de Nankai, na China, utilizando podócitos – células que recobrem a superfície externa da membrana basal de glomérulos, e que servem como barreiras de carga e tamanho na excreção de proteínas –, buscou investigar se as CuO-NPs de 30 nm nas concentrações de 0, 5, 50 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ causam apoptose nesse tipo celular. A detecção de células em estado apoptótico foi realizada através de citometria de fluxo, e os pesquisadores constataram morte celular ocorrendo de maneira concentração-dependente. Investigou-se então a formação de ROS intracelular e encontraram concentrações elevadas destas, assumindo que este foi o motivo do desencadeamento da apoptose observada (XU et al., 2013).

Em 2015, foi publicado um trabalho demonstrando que as CuO-NPs de 50 nm causaram um aumento na expressão do RNA mensageiro (RNAm) das interleucinas (IL) 6 e 8 (mediadores pró-inflamatórios) em células da linhagem H292, de epitélio de vias aéreas, de forma concentração-dependente. Outra proteína que teve seus níveis de produção elevados foi a MUC5AC, que é responsável pela formação de muco. Também se detectou níveis elevados de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK) nessas células, bem como aumento na sinalização mediada por essas proteínas, que justifica o aumento na produção dos mediadores pró-inflamatórios. Com esses dados, os pesquisadores puderam concluir que, no caso deste ensaio *in vitro*, as CuO-NPs se mostraram possivelmente tóxicas para o trato respiratório, uma

vez que são capazes de elevar a produção de muco e de mediadores pró-inflamatórios (KO et al., 2015).

Em um trabalho de 2017, pesquisadores utilizaram linfócitos extraídos do sangue de 20 doadores saudáveis para avaliar a viabilidade celular pós tratamento com CuO-NPs de 40 nm nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 2, e 5 mM. Para isso, essas células foram incubadas com diferentes concentrações das NPs por 12 horas e realizou-se o ensaio do *Tripán Blue*, um marcador de morte celular que tem a característica de acumular dentro de células mortas. A IC₅₀ foi calculada em 382 µM para esse tipo celular específico. Em seguida, estudou-se a formação de ROS e a peroxidação lipídica na cultura celular, estando ambas significativamente aumentadas em relação ao controle. E, para finalizar, uma vez que as mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção da maior parte das moléculas de ROS, foi estudado o potencial membranar destas, e notaram que este encontrava-se diminuído nas células tratadas com as CuO-NPs, levando os autores a concluir que estas NPs são capazes de causar colapso mitocondrial em linfócitos isolados (ASSADIAN et al., 2017).

Para verificar a genotoxicidade das CuO-NPs, frente a células de epitélio humano da linhagem A549 – de câncer pulmonar – obtidas do ATCC, pesquisadores utilizaram os ensaios de viabilidade celular por (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol (MTT) e o teste Cometa. Em ambos os experimentos se observou que a toxicidade das NPs era concentração-dependente. As células expostas encontravam-se mais arredondadas que as do grupo controle e a taxa de morte celular encontrada foi maior. No teste Cometa, para todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 µg.mL⁻¹), obteve-se um tamanho de cauda maior do que o do controle, indicando número mais elevado de quebras no DNA das células tratadas com as CuO-NPs. Então, os pesquisadores mediram a formação de ROS e averiguaram que se encontrava superior nestas células, o que pode ter sido uma das causas dos múltiplos rompimentos no material genético (AKHTAR et al., 2016)

Outro estudo utilizando células da mesma linhagem descrita acima realizou uma comparação da toxicidade das CuO-NPs com outras NPs – dentre elas TiO₂-NPs e ZnO-NPs – e nanotubos de carbono. As concentrações testadas para todas foram 40 e 80 µg.mL⁻¹. Os pesquisadores analisaram citotoxicidade, dano ao material genético pelo teste de Cometa e presença de ROS intracelular. Das NPs estudadas, CuO-NPs se mostraram as mais danosas às células, com perda da viabilidade celular

calculado em 96%, enquanto as ZnO-NPs, com 38% de detrimento, foram as segundas colocadas na escala de dano. Todas as partículas estudadas causaram algum dano material genético das células, sendo as CuO-NPs novamente as mais potentes, com formação de cauda longa. No ensaio da formação de ROS intracelular, as únicas NPs que se mostraram capazes de aumentar a produção destas foram as CuO-NPs. Ao final do estudo, os pesquisadores concluíram então que o tamanho de partícula é muito importante para determinação da toxicidade, uma vez que, das partículas estudadas, as CuO-NPs eram as menores, tendo entre 20 e 40 nm, enquanto todas as outras se aproximavam de 100 nm (KARLSSON et al., 2008). Contudo, o trabalho não fornece dados sobre o funcionamento de mecanismos de reparo do DNA.

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores publicou um trabalho comparando a toxicidade de nano e micropartículas de mesmo material, utilizando o mesmo tipo celular. Para isso eles utilizaram novamente diversos materiais, como CuO-NPs, Fe₂O₃-NPs e TiO₂-NPs, todas com menos de 60 nm. Além de repetir os ensaios realizados anteriormente, eles também estudaram a despolarização mitocondrial. Novamente o CuO se mostrou deletério para esse tipo celular, com 96% de inviabilidade celular no caso das CuO-NPs e 31% para as CuO-MPs. As outras partículas estudadas não afetaram as células de forma estatisticamente significativa. No ensaio da despolarização mitocondrial, as CuO-NPs foram as únicas capazes de gerar esse fenômeno, que está diretamente ligado ao aumento na produção de ROS. No ensaio Cometa, entre as partículas em escala nano, as CuO-NPs foram as mais deletérias ao DNA. Porém, em escala micrométrica, as TiO₂ causaram mais dano, gerando caudas maiores. Com esse trabalho os pesquisadores concluíram que o tamanho de partícula afeta diretamente a toxicidade do material, mas nem sempre a partícula em escala nano será a mais tóxica, dependendo do material estudado (KARLSSON et al., 2009).

Alguns anos mais tarde, Cronholm e colaboradores realizaram um estudo comparando a toxicidade das NPs com o íon do metal correspondente, também com as células A549. Após quatro horas de exposição aos materiais, realizou-se a dose intracelular dos metais estudados (Cu e Ag) e percebeu-se que, tanto nas células tratadas com CuO-NPs (de 20 a 200 nm) quanto as com Ag-NPs (de 20 a 40 nm), a concentração intracelular do metal era muito maior do que nas tratadas com os íons correspondentes. Através da técnica de MET, os pesquisadores puderam verificar a

presença de ambas as NPs dentro das células. Nos ensaios de citotoxicidade e Cometa, tanto a morte celular quanto o dano ao DNA só foram verificados na cultura exposta às CuO-NPs. Com estes ensaios demonstrou-se que, apesar das NPs terem mais facilidade para penetrar as células que os íons correspondentes, a toxicidade inerente a cada material que será o fator determinante para morte celular (CRONHOLM et al., 2013).

Pesquisadores da China também estudaram a toxicidade das CuO-NPs frente as células A549. Em ensaio de viabilidade celular, eles demonstraram que as NPs, em baixas concentrações (0,5 e 1 mg.L⁻¹), ao contrário do esperado, na verdade estimularam o desenvolvimento celular. Os autores atribuíram esse efeito ao fato de que o Cu é um elemento traço essencial para o desenvolvimento de organismos. Porém, em concentrações mais elevadas (entre 5 e 100 mg.L⁻¹), as CuO-NPs já se mostraram tóxicas às células, reduzindo sua viabilidade, levando ao desencadeamento de apoptose. Então, utilizando a técnica de MET, observou-se que as CuO-NPs se localizavam principalmente no citoplasma, no núcleo e nas mitocôndrias das células. Uma vez que esta é a principal organela relacionada a produção de ROS, foram investigadas as taxas e notou-se que, nas células tratadas com CuO-NPs, a formação destes compostos estava bastante elevada. Por terem visualizado as NPs no núcleo, também foi realizado um ensaio Cometa, para averiguar a integridade do material genético destas células. Neste ensaio, demonstrou-se que, nas concentrações acima de 15 mg.L⁻¹, já é possível observar caudas, e estas ficavam maiores com o aumento da concentração. Os autores finalizam o trabalho afirmando que o estresse oxidativo gerado pelas ROS é o principal motivador da perda de viabilidade celular, e que as CuO-NPs podem afetar o material genético da célula, apresentando risco de mutagenicidade (WANG et al., 2012).

Também utilizando a linhagem celular tumoral pulmonar, Kalaiarasi e colaboradores (2017) demonstraram através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e *Western Blotting*, que as CuO-NPs foram capazes de reduzir a expressão do RNAm de proteínas ligadas à inibição da apoptose em células de câncer, além de aumentar a produção de proteínas como p53 e p21, que participam no processo de morte celular. Eles examinaram também a expressão do RNAm das caspases 3, 8 e 9 após oito horas de tratamento com as NPs e observaram valores elevados em relação ao controle. Então concluiu-se que as CuO-NPs podem até

serem úteis no tratamento de câncer, podendo ser utilizadas como coadjuvantes em formulações antitumorais (KALAIARASI et al., 2017).

Piret e colaboradores (2012) avaliaram CuO-NPs de dois tamanhos distintos – uma população de 12 nm e outra 50 – 80 nm, além de íons Cu^{2+} . Elas foram testadas frente a cultura de hepatócitos humanos do tipo HepG2 em ensaio de citotoxicidade, na faixa de concentração de 0,4 a 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tendo como resultado que os íons foram mais deletérios que as NPs, sendo as CuO-NPs de 12 nm mais danosas para as células que as de 50 – 80 nm. Foram então realizados dois ensaios distintos de oxidação, para averiguar a quantidade de ROS formado no meio intracelular, e o resultado corroborou o encontrado anteriormente, com os íons sendo os principais produtores de ROS, seguidos pelas CuO-NPs de 12 nm e as de 50 – 80 nm por último. Findo o estudo, concluiu-se então que os efeitos negativos das CuO-NPs frente aos hepatócitos se devem ao estresse oxidativo gerado pelas ROS (PIRET et al., 2012).

1.4.3 Toxicidade *in vivo* das CuO-NPs

Poucos ensaios realizados *in vivo* sobre a toxicidade de CuO-NPs podem ser encontrados na literatura. Em um destes estudos, os pesquisadores verificaram que, após exposição intraperitoneal em ratos Wistar machos adultos, as NPs (10 a 70 nm), administradas na dose de 0,75 mg.mL^{-1} , foram detectadas em determinadas porções do cérebro, como no hipocampo, córtex, amígdala e estriado. Então, realizou-se experimentos comportamentais com os ratos tratados, utilizando o labirinto aquático de Morris para verificar aquisição de memória. Com isso, notou-se que o grupo tratado com as CuO-NPs, apesar de nadar na mesma velocidade que o grupo controle, sempre demorava mais para atingir o objetivo final do teste – encontrar uma plataforma submersa escondida, onde o animal pode descansar. Em seguida, através de microscopia, observou-se que o número de neurônios localizados no hipocampo do grupo tratado era menor que do grupo controle, o que pode levar a dificuldades na aquisição de novas memórias e aprendizagem. Por fim, demonstrou-se que o nível de ROS presente no hipocampo de animais tratados com CuO-NPs se encontrava acima do encontrado no grupo controle, concluindo que as NPs induziram a formação de ROS *in vivo* (AN et al., 2012).

Utilizando ratos machos da linhagem F344 com 10 semanas de vida, pesquisadores verificaram a toxicidade pulmonar de diferentes partículas, incluindo as

CuO-NPs e as CuO-MPs. A administração realizada foi intratraqueal através de aerossol, na dose de 2 mg.kg^{-1} . Dos 17 ratos tratados com as CuO-NPs, 14 foram a óbito no primeiro dia, e os três restantes foram eutanasiados no dia seguinte, para exames anatomopatológicos. No pulmão destes animais foram encontrados edemas severos. Todos os roedores tratados com as CuO-MPs sobreviveram até o vigésimo oitavo dia pós-tratamento e passaram pela eutanásia humanitária neste dia. Seus pulmões também apresentavam edemas, menos severos que dos animais mortos no primeiro dia. Outros órgãos não apresentaram alterações significativas (YOKOHIRA et al., 2008).

Dando continuidade ao trabalho anterior, Yokohira e colaboradores (2009) estudaram a carcinogenicidade das CuO-NPs no mesmo modelo animal descrito anteriormente. Para isso, utilizaram como agente iniciador uma nitrosamina específica do tabaco, que foi constantemente dissolvida na água dos ratos durante os dias do estudo. A administração das NPs e das MPs foi realizada de forma intratraqueal utilizando um aerosolizador e foi utilizada a dose de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Tanto as CuO-NPs quanto as CuO-MPs induziram a formação de nódulos no pulmão, que foram consideradas hiperplasias pulmonares. As CuO-NPs ainda induziram inflamação nos alvéolos (YOKOHIRA et al., 2009).

Park e colaboradores (2016), utilizando camundongos BALB/c asmáticos, demonstraram que as CuO-NPs com menos de 50 nm, quando instiladas de forma intranasal nas doses de 25, 50 e $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$, foram capazes de agravar inflamação das vias aéreas e aumentar a produção de muco. Os pesquisadores também determinaram a quantidade de ROS e das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α presentes no fluido de lavagem brônquio-alveolar, estando todos aumentados nos grupos tratados, em relação ao controle. Por fim, verificaram a dose de imunoglobulina E no soro e proteínas inflamatórias no tecido pulmonar, que também se encontravam muito elevados quando comparado com o grupo não-tratado. Em conclusão, no caso de portadores de asma, a inalação de CuO-NPs é ainda mais prejudicial à saúde, levando ao agravamento da condição clínica do indivíduo. Os responsáveis pelo estudo finalizam o trabalho advertindo que pessoas asmáticas, especialmente trabalhadores fabris, devem ser cautelosos ao entrarem em contato com as CuO-NPs (PARK et al., 2016).

Tendo como base o guia 412 da OECD, pesquisadores estudaram a toxicidade pulmonar das CuO-NPs de 15 a 20 nm, em ratos machos com oito semanas de vida,

no início do estudo. Eles desenvolveram um protocolo de estudo de inalação com cinco dias de exposição e 23 dias de recuperação, e a eutanásia ocorrendo no 28º dia. A dose de CuO-NPs utilizada foi fixada em 10 mg.m^{-3} , e os animais foram separados em grupos, que tiveram tempos de exposição variados em 18, 36, 90, 180 e 360 minutos. Durante os dias de administração, os grupos eram sempre expostos nos mesmos tempos, e na mesma hora do dia. Alguns animais foram selecionados para serem eutanasiados no sexto dia, com o objetivo de averiguar a quantidade de CuO-NPs espalhada pelos órgãos destes e, em seus pulmões, encontrou-se a carga média de 0,085 mg por órgão no grupo exposto por mais tempo às CuO-NPs. O exame histopatológico realizado nesses animais também revelou destruição parcial do epitélio olfatório. A exposição às CuO-NPs não alterou padrões de comportamento, não gerou sinais de toxicidade evidentes nem ocasionou mortes ao longo dos 28 dias de estudo. O peso de todos os animais – expostos e controle – se encontravam estatisticamente similares, bem como o peso dos órgãos isolados – pulmões, cérebro, fígado, baço, rins e testículos. Nos exames anatomo e histopatológicos realizados ao fim do ensaio, somente os pulmões apresentaram alterações clínicas, com fibrose tecidual nos pulmões dos ratos expostos às CuO-NPs, revelando a ocorrência de alveolite e bronquiolite, com sinais inflamatórios ainda presentes. Ademais, os pesquisadores notaram que quanto maior o tempo de exposição às CuO-NPs, mais acentuada era a fibrose tecidual encontrada. No exame hematológico, os animais tratados apresentaram taxas mais elevadas de neutrófilos e macrófagos que os do grupo controle, corroborando os sinais de inflamação encontrados nos pulmões. Os pesquisadores levantam então a hipótese das CuO-NPs terem sido fagocitadas pelos macrófagos, e, ao entrarem em contato com o meio ácido presente no interior dos lisossomas, terem sido degradadas, liberando íons Cu^{2+} , que podem ter sido responsáveis por parte dos efeitos encontrados. Para finalizar, os autores criticam o próprio trabalho, ao perceberem que deveriam ter realizado o mesmo estudo utilizando a forma micrométrica do CuO, para fins de comparação (GOSENS et al., 2016).

Pesquisadores russos desenvolveram um ensaio de toxicidade sub-crônica com CuO-NPs de $20 \pm 10 \text{ nm}$ utilizando ratos de sexo feminino, entre 150 a 220 g de peso corporal no início dos testes. A dose de 10 mg.kg^{-1} foi aplicada de forma intraperitoneal, três vezes por semana, durante 28 dias, totalizando cerca de 90 mg.kg^{-1} por animal. Ao longo dos 28 dias de tratamento, dados sobre sinais clínicos que

indicassem toxicidade foram buscados, mas não foram observadas anormalidades. Ao final do estudo, os animais foram eutanasiados e o conteúdo de cobre nos órgãos foi analisado por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente, e notou-se o acúmulo do metal especialmente no fígado e nos rins. No sangue, encontrou-se doses de íons cobre acima do esperado, indicando que, em algum momento as CuO-NPs foram degradadas na forma iônica, liberando Cu^{2+} na corrente sanguínea dos animais (PRIVALOVA et al., 2014).

Ao estudarem melhor o fígado desses animais, notou-se que as células de Kupffer – macrófagos especializados localizados no fígado – encontravam-se mais numerosos e ativos em relação ao grupo controle, indicando que as CuO-NPs que chegavam a esse órgão desencadeavam uma reação citotóxica no local, capaz de ativar o sistema imune especializado. Nos rins, foram encontradas lesões degenerativas e alterações necrobióticas em células do epitélio tubular (PRIVALOVA et al., 2014).

Privalova e colaboradores (2014) também observaram genotoxicidade, caracterizada por fragmentação de material genético, em células provenientes dos rins e fígado dos animais, demonstrando que, além do dano citotóxico das CuO-NPs, elas também foram responsáveis por romper o DNA de hepatócitos e células renais *in vivo*, corroborando os achados *in vitro* discutidos anteriormente.

Nos resultados de exames hematológicos e bioquímicos, foram encontrados achados clínicos importantes, como redução da contagem de hemoglobina e aumento no número de reticulócitos, indicando o efeito hemolítico causado pelos íons Cu^{2+} , redução nos níveis de ceruloplasmina e das transaminases hepáticas, que tradicionalmente são consideradas marcadores de lesão hepática (PRIVALOVA et al., 2014).

Os pesquisadores concluíram então que, em um ensaio subcrônico, com exposição não-diária às CuO-NPs, foi possível observar genotoxicidade, e que este pode ser o efeito tóxico mais deletério de todos, uma vez que ao longo dos 28 dias nenhum animal apresentou sinais de toxicidade visíveis externamente. E demonstrou-se que, em casos de exposição continuada, os danos hepáticos e renais podem ser muito elevados (PRIVALOVA et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a legislação vigente, os objetivos centrais da vigilância sanitária são identificar, prevenir e eliminar riscos à saúde da população (BRASIL, 1990), termos conhecimento sobre a toxicidade de substâncias utilizadas em produtos destinados ao uso humano é de interesse desta ciência, visando o uso seguro das CuO-NPs.

Uma vez que as CuO-NPs encontram-se dispersas no ar em ambientes fabris, faz-se necessário o conhecimento sobre sua toxicidade no tocante ao trato respiratório. Por este motivo, muitos trabalhos *in vitro* e *in vivo* (por via inalatória) tiveram como alvos centrais os órgãos responsáveis pela respiração, especialmente os pulmões (KARLSSON et al., 2008, 2009; YOKOHIRA et al., 2008, 2009; CRONHOLM et al., 2013; PARK et al., 2016; AKHTAR et al., 2016; GOSENS et al., 2016; KALAIARASI et al., 2017). Porém, de acordo com Fröhlich e Salar-Behzadi (2014), apesar de serem muito utilizados para ensaios de toxicidade laboratoriais, roedores não são o modelo mais correto a ser utilizado, uma vez que são respiradores nasais obrigatórios – ou seja, respiram somente pelo nariz, diferindo dos humanos nesse ponto. Portanto, este modelo não é capaz de fornecer dados completos em relação à toxicidade das substâncias testadas.

Além deste motivo, como foi apresentado anteriormente, nos últimos anos, vem ocorrendo um aumento da utilização industrial das CuO-NPs em produtos que são de interesse humano, como os citados na introdução. Com isso, o estudo da toxicidade por via oral dessas NPs se faz de extrema importância na montagem do painel de informações toxicológicas acerca das CuO-NPs.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* de nanopartículas de óxido de cobre, após exposição por via oral.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar as CuO-NPs de acordo com seu tamanho, morfologia, potencial Zeta e índice de polidispersão;

Estudar o tamanho, potencial Zeta e índice de polidispersão das CuO-NPs frente a diferentes faixas de pH, simulando o trato gastrointestinal humano;

Avaliar a toxicidade aguda oral de CuO-NPs em ratos Wistar, seguindo as diretrizes do guia 420 da OECD;

Verificar variações em parâmetros hematológicos e bioquímicos após exposição única às CuO-NPs;

Analisar possíveis alterações morfológicas em órgãos isolados de rato Wistar e/ou em seus pesos;

Observar a ocorrência, ou não, de modificações teciduais através de exame de histopatologia em órgãos isolados de rato Wistar.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização das CuO-NPs

As CuO-NPs utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Mauro Granjeiro do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). As mesmas são oriundas do consórcio NanoValid, do qual o professor é colaborador.

As CuO-MPs empregadas no estudo são da marca Sigma-Aldrich, Lote MKAA1788, com 98% de pureza, e foram gentilmente cedidas por Sibeles Guimarães, responsável do estoque de substâncias químicas inorgânicas do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). A ficha analítica fornecida pela empresa encontra-se no Anexo 1.

4.1.1 Tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz

A análise do tamanho de partícula do material nanoparticulado foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Helvécio Rocha, do Laboratório de Micro e Nanotecnologia do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Para esse ensaio, foi aplicada a técnica do DLS, em um analisador de partículas Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS90. Foi utilizado LASER de He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) e detector de ângulo fixo em 90° . As amostras foram diluídas até a concentração de aproximadamente $0,06 \text{ mg.ml}^{-1}$. O meio dispersante foi água ultrapura e a análise foi toda realizada à temperatura ambiente. As suspensões foram submetidas a agitação em banho de ultrassom da marca Unique, modelo USC 2800A, com frequência de 40 kHz e potência de 154 W, por 5 minutos, a fim de melhor dispersar as nanopartículas.

4.1.2 Morfologia e tamanho de partícula por microscopia eletrônica de transmissão

A análise de MET foi realizada em parceria com o Dr. Fábio Rocha Formiga, do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ. As amostras de CuO-NPs e CuO-MPs foram pesadas e ressuspensas em água ultrapura deionizada na concentração de 5 mg.mL^{-1} . 1 mL da suspensão foi agitado com vórtex por 40 segundos para

homogeneização. 20 μL da amostra foram adicionados sobre uma grade de cobre (3 mm, 400 mesh – SPI Supplies, EUA) revestida por formvar. Após 20 minutos, adicionou-se 20 μL de contraste de uranila recém centrifugado (10.000 rpm por 10 minutos). Após 1 minuto, o excesso foi removido pelas laterais da grade, com o auxílio de tiras de papel filtro. As amostras processadas foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM 1230 (Jeol LTD, Japão). As análises das imagens obtidas foram realizadas no programa ImageJ, pela Dra. Beatriz Patrício de Farmanguinhos.

4.1.3 Tamanho das CuO-NPs em diferentes valores de pH do trato gastrointestinal

Para este ensaio foi utilizado o mesmo equipamento descrito no item 4.1.1. As amostras foram diluídas até a concentração de aproximadamente $0,06 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os meios de dispersão foram soluções de diferentes valores de pH, mimetizando o trato gastrointestinal (TGI) humano. Para o preparo das soluções foi utilizado o protocolo descrito na *United States Pharmacopeia* (USP), conforme demonstrado no Quadro 2:

Quadro 2 - Composição dos meios de diferentes valores de pH utilizados.

pH	Composição
1,2	250 mL de solução KCl 0,2 M + 425 mL de solução de HCl 0,2 M + H ₂ O em quantidade suficiente para 1 L de solução
4,5	3 g de Acetato de Sódio tri-hidratado + 14 mL de solução de Ácido Acético 2 N + H ₂ O em quantidade suficiente para 1 L de solução
5,8	250 mL de solução de KH ₂ PO ₄ 0,2 M e 18 mL de solução de NaOH 0,2 M + H ₂ O em quantidade suficiente para 1 L de solução
6,8	250 mL de solução de KH ₂ PO ₄ 0,2 M e 112 mL de solução de NaOH 0,2 M + H ₂ O em quantidade suficiente para 1 L de solução
7,2	250 mL de solução de KH ₂ PO ₄ 0,2 M e 173,5 mL de solução de NaOH 0,2 M + H ₂ O em quantidade suficiente para 1 L de solução

Fonte: (adaptado de REAGENTS, 2016).

Após o preparo das soluções, os pH foram aferidos em medidor de pH da marca Mettler-Toledo localizado no Setor de Meios de Cultura do Departamento de Microbiologia do INCQS.

As suspensões de CuO-NPs foram preparadas momentos antes da leitura, utilizando uma solução mãe preparada em água ultrapura na concentração de 1,0 mg.ml⁻¹ e diluídos de 1:10 com as soluções de diferentes valores de pH. As suspensões foram submetidas a agitação em banho de ultrassom por 5 minutos, a fim de melhor dispersar as NPs.

4.2 Teste de toxicidade aguda

4.2.1 Preparo das suspensões de CuO-NPs e CuO-MPs

As suspensões foram preparadas sempre cerca de 30 minutos antes de serem administradas aos animais. Para isso, o material a ser testado foi pesado em balança de precisão da marca Edutec, modelo EEQ9003F-B, com faixa de utilização entre 0,0001 e 220 g, localizada no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do INCQS e suspenso em água ultrapura através de agitação em ultrassom da marca Unique, modelo USC 1400, na frequência de 1400 Hz e potência de 120 W, do Laboratório de Toxicologia do mesmo departamento.

Para cada dose utilizada, foram geradas suspensões cujas concentrações permitissem que o máximo de líquido administrado a cada animal fosse de 2 mL. Abaixo se encontra resumido o esquema de preparo, com a regra de 3 utilizada e as concentrações finais das suspensões.

Dose desejada em mg – 1000 g de peso do animal

Concentração a ser suspensa em 2 mL – 200 g de peso do animal

Dose de 50 mg.kg⁻¹ – suspensão na concentração de 5 mg.mL⁻¹

Dose de 300 mg.kg⁻¹ – suspensão na concentração de 30 mg.mL⁻¹

Dose de 2000 mg.kg⁻¹ – suspensão na concentração de 200 mg.mL⁻¹

Para efeitos de cálculo, foi assumido o valor de 200 g de peso para os animais, sabendo que todos estariam abaixo deste, garantindo assim o volume abaixo de 2 mL a ser administrado.

4.2.2 Animais

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação – CEUA/Fiocruz, sob a licença LW-37/17, atendendo a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008). A folha de aprovação do CEUA encontra-se no Anexo 2.

Foram utilizados ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, de sexo feminino, pesando inicialmente entre 160 e 180 g. Todos os animais foram fornecidos pelo ICTB – Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, da FIOCRUZ. O *status* genético da espécie utilizada é conhecido como *outbreed*, e sua condição sanitária é denominada como “convencional controlada” (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006). No momento do ensaio, todas as ratas eram nulíparas e não se encontravam prenhes.

Os ensaios foram realizados no Serviço de Animais de Laboratório (SAL), ligado ao DFT/INCQS.

Os animais passaram por um período de aclimatação de 5 dias antes da administração das substâncias (CuO-NPs ou CuO-MPs), e foram abrigados em gaiolas individuais para correta avaliação da ingestão alimentar diária e evitar falhas na verificação dos parâmetros clínicos.

Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, em condições ambientais de temperatura entre 20 a 24 °C, umidade relativa do ar entre 50 a 60%, e ciclo claro-escuro de 12 horas, com a luz sendo acesa às 8:00 horas.

A troca de água foi feita semanalmente, e fornecida *ad libitum*, em bebedouros do tipo “mamadeira”, de polipropileno autoclavável, com rolha de borracha nitrílica com furo vulcanizado e bico em aço inoxidável, de 500 ml de capacidade. A ração utilizada foi da marca Nuvilab®, com a seguinte composição:

Quadro 3 - Composição da ração utilizada de marca Nuvilab®

Nutrientes	Níveis de garantia por quilograma do produto
Vitamina A	13000 UI
Vitamina D3	2000 UI
Vitamina E	34 UI
Vitamina K3	3 mg/kg
Vitamina B1	5mg/kg
Vitamina B2	6 mg/kg
Vitamina B6	7 mg/kg
Vitamina B12	22 µg/kg
Niacina	60 mg/kg
Pantotenato de Calcio	20 mg/kg
Ácido Fólico	1 mg/g
Biotina	0,5 mg/kg
Colina	1900 mg/kg
Sódio	2700 mg/kg
Cálcio	14 g/kg
Fósforo	6 g/kg
Ferro	50 mg/kg
Manganês	60 mg/kg
Zinco	60 mg/kg
Cobre	10 mg/kg
Iodo	2 mg/kg
Selênio	0,5 mg/kg

Cobalto	1,5 mg/kg
Flúor	80 mg/kg
Lisina	12 g/kg
Metionina	4000 mg/kg
Aditivo BHT	100 mg/kg

Fonte: (Nuvilab®, [s.d.]).

4.2.3 Desenho Experimental

Os animais foram divididos em um grupo controle e três grupos experimentais, para cada material analisado, totalizando 40 animais para avaliação das CuO-NPs e mais 40 para as CuO-MPs.

Cada grupo era composto por 10 animais, alojados individualmente, e distribuídos da seguinte forma:

Grupo 1 – Controle negativo, utilizou-se água ultrapura;

Grupo 2 – CuO-NPs ou CuO-MPs, 50 mg.kg⁻¹;

Grupo 3 – CuO-NPs ou CuO-MPs, 300 mg.kg⁻¹;

Grupo 4 – CuO-NPs ou CuO-MPs, 2000 mg.kg⁻¹.

Os animais foram submetidos ao jejum prévio de alimento na noite anterior a administração das substâncias (*overnight*).

Para a administração por via oral, os animais foram contidos mecanicamente e a suspensão foi então dispensada diretamente no estômago destes, através da utilização de sonda de gavagem (Figura 1) introduzida na boca do animal e conduzida pelo esôfago.

Figura 1- Sonda para gavagem de ratos



Fonte: (Do autor, 2017).

Cada animal teve sua dose individualizada, de acordo com o peso corporal verificado momentos antes da administração, e o volume final foi ajustado para que não excedesse ao preconizado - 2 ml por 200 g de peso - para líquidos aquosos (LAPICHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Os animais foram observados ao longo de 14 dias, sendo considerado como “dia 1”, o da administração das suspensões de CuO-NPs ou CuO-MPs e “dia 14” o anterior ao procedimento de eutanásia.

4.3 Parâmetros avaliados

4.3.1 Avaliação do ganho de peso diário

O peso corporal foi registrado no dia da administração das suspensões e este procedimento foi repetido diariamente, sempre no mesmo horário, ao longo dos 13 dias de observação. Os valores mensurados foram anotados em tabela própria. Para o registro do peso dos ratos, foi utilizada a balança da marca Acculab® modelo Vicon, com faixa de utilização de 0,01 a 300 g, localizada na sala de experimentação dos animais.

4.3.2 Avaliação da ingestão alimentar diária

A ingestão alimentar foi registrada diariamente e anotada em tabela própria. No primeiro dia, 4 horas após a administração da suspensão de CuO-NPs ou CuO-MPs, foram fornecidos cerca de 40 g de alimento a cada animal. Em cada um dos 13 dias subsequentes de observação, o restante de alimento do dia anterior foi pesado e complementado até aproximadamente 40 g, mantendo a homogeneidade do fornecimento diário de ração. Para o registro da quantidade de alimento ingerido pelos ratos, foi utilizada a balança Acculab® modelo Vicon com faixa de utilização de 0,01 a 300 g.

4.3.3 Avaliação dos sinais clínicos selecionados

Os animais foram avaliados após a administração oral, no primeiro dia nos tempos 30 minutos, 01, 02 e 03 horas. Nos 13 dias seguintes foram avaliados uma vez ao dia, sempre no mesmo horário – aproximadamente às 13:00 horas –, totalizando 14 dias de observação.

Uma vez que as diretrizes não são específicas quanto a quais possíveis sinais de toxicidade averiguar, foi utilizada uma coletânea de sinais clínicos comuns à espécie avaliada e aos sinais de toxicidade adaptada do trabalho de Bravin (2016), sendo eles:

Exploração: observou-se se os animais exploravam toda a área da caixa;

Frêmito vocal: verificou-se se os sinais sonoros emitidos pelos animais dos grupos-teste estavam aumentados ou diferentes dos pertencentes ao grupo controle;

Resposta ao toque: observou-se se os animais respondiam exageradamente ao estímulo do toque durante a manipulação;

Ataxia: verificou-se se ocorria falta de coordenação na ação de movimentar-se;

Piloereção: observou-se se os animais estavam com os pelos eriçados;

Defecação: comparou-se se as fezes expelidas eram diferentes em quantidade ou forma, com as do grupo controle.

4.3.4 Avaliação hematológica e parâmetros bioquímicos

Finalizados os 14 dias de observações, foi realizada a coleta sanguínea para avaliação hematológica e bioquímica. Para isso, foi administrado tiopental em dose capaz de induzir plano anestésico nos animais – cerca de 0,5 mL da suspensão comercial Thiopentax[®]. Então, após a verificação da perda dos reflexos palpebrais e ausência da movimentação da pata após pinçamento da pata, a coleta sanguínea foi efetuada através de punção cardíaca com exposição do coração através de procedimento cirúrgico para abertura do tórax do animal. Foram utilizadas seringas de 5 ml e agulha 25 x 0,7.

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas através da utilização da plataforma de análises clínicas do ICTB via Plataforma Tecnológica do Programa de Desenvolvimento e Insumos para a Saúde da FIOCRUZ.

Os seguintes parâmetros foram analisados:

- Avaliação hematológica: Hemograma contendo contagem de hemácias (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), avaliação do hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração da hemoglobina corpuscular média (MCHC), contagem de leucócitos (WBC), e contagem de plaquetas (plaq).
- Avaliação bioquímica: sódio, cloro, glicose, creatinina, fósforo, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), creatinina kinase (CK), fosfatase alcalina, colesterol, ferro e proteínas totais.

A eutanásia de cada animal se deu juntamente com a coleta sanguínea, através da punção cardíaca total, e o óbito foi verificado por ausência de batimentos cardíacos e de respiração.

4.3.5 Avaliação anatomopatológica

Foi realizado o exame anatomopatológico macroscópico de todos os animais (grupos-teste e controle) a fim de se coletar o maior número de informações sobre possíveis alterações funcionais dos órgãos, bem como sinais sistêmicos de toxicidade.

4.3.6 Avaliação dos pesos dos órgãos isolados

Os órgãos selecionados para pesagem isolada foram rins, baço, fígado e cérebro. O procedimento foi realizado em balança semi-analítica de marca Ohaus com faixa de pesagem entre 0,15 e 1500 g, localizada no Laboratório de Fisiologia do DFT.

4.3.7 Avaliação histopatológica de órgãos selecionados

A avaliação histopatológica dos órgãos selecionados – fígado, baço e rins – foi realizada em parceria com a Prof.a. Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida, do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Biomédica (LMPB), do Instituto de Saúde de Nova Friburgo (ISNF) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, no mínimo por 48 horas, com pH neutro; clivadas em fragmentos menores com 2 a 4 mm de espessura, identificadas, colocadas em “cassetes” para processamento de rotina e inclusão em parafina, sendo encaminhadas para o LMPB.

Os fragmentos foram então processados pela técnica histológica de rotina (desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina). Procedeu-se a microtomia e as lâminas histológicas confeccionadas foram coradas pela coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (HE), seguido de observação e análise em microscópio da marca Nikon, modelo Eclipse E200 em diferentes aumentos (40 X, 100 X e 400 X) e registros fotográficos.

4.4 Análise estatística

Os resultados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste Kolmogorov-Smirnov, e para essa avaliação, um valor de p maior que 0,1 indica que os dados foram considerados normais.

Como todos os dados foram considerados normais, utilizou-se então o teste de Levene para a homocedasticidade, onde as variâncias foram consideradas normais quando o valor de p foi maior que 0,05.

Para as análises de ganho de peso e consumo alimentar, foi utilizada análise de variâncias (ANOVA) de medidas repetidas, sendo o fator DIA usado como

repetição. Foi considerado estatisticamente significativo quando p foi menor que 0,05, e o teste de Bonferroni foi utilizado para comparações múltiplas.

Para os exames bioquímicos e hematológicos, utilizou-se o teste ANOVA univariada juntamente com o teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Foram considerados significativamente diferentes quando p maior que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa IBM® SPSS 20.0 para Mac.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das CuO-NPs

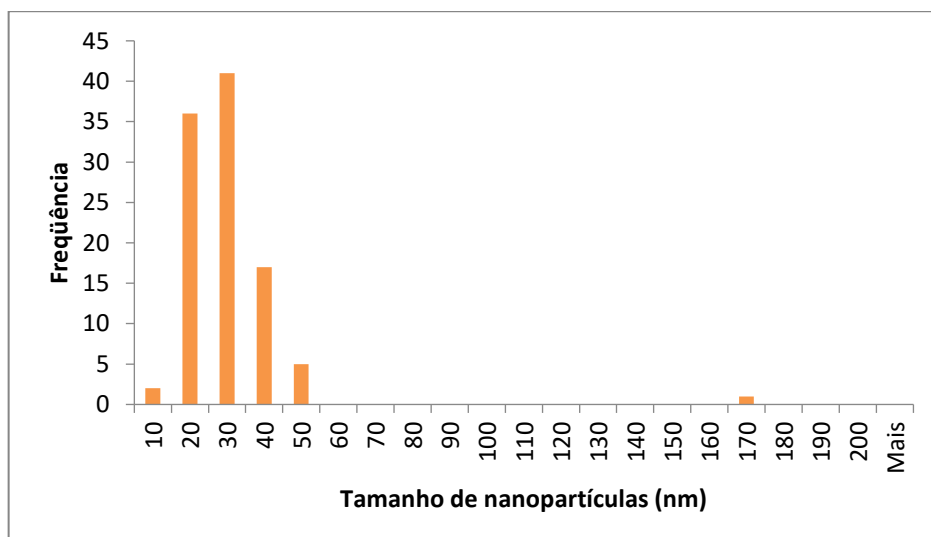
5.1.1 Análise do tamanho de partícula pela técnica de DLS

Na análise de tamanho de partícula das CuO-NPs, utilizando água ultrapura como meio dispersante, o valor médio encontrado foi de $166,9 \pm 2,54$ nm. O PDI obtido foi 0,169 e o potencial Zeta medido foi $16,7 \pm 0,86$ mV.

5.1.2 Morfologia e tamanho de partícula por microscopia eletrônica de transmissão

Na análise de MET, encontrou-se o tamanho médio de $25,17 \pm 8$ nm para as CuO-NPs. Elas apresentavam formato arredondado e aglomerados menores, contendo menos partículas que os encontrados na amostra de CuO-MPs. O gráfico 1 apresenta a distribuição de tamanho das CuO-NPs. As figuras 2 e 3 são referentes às eletromicrografias de MET das CuO-NPs e das CuO-MPs, respectivamente.

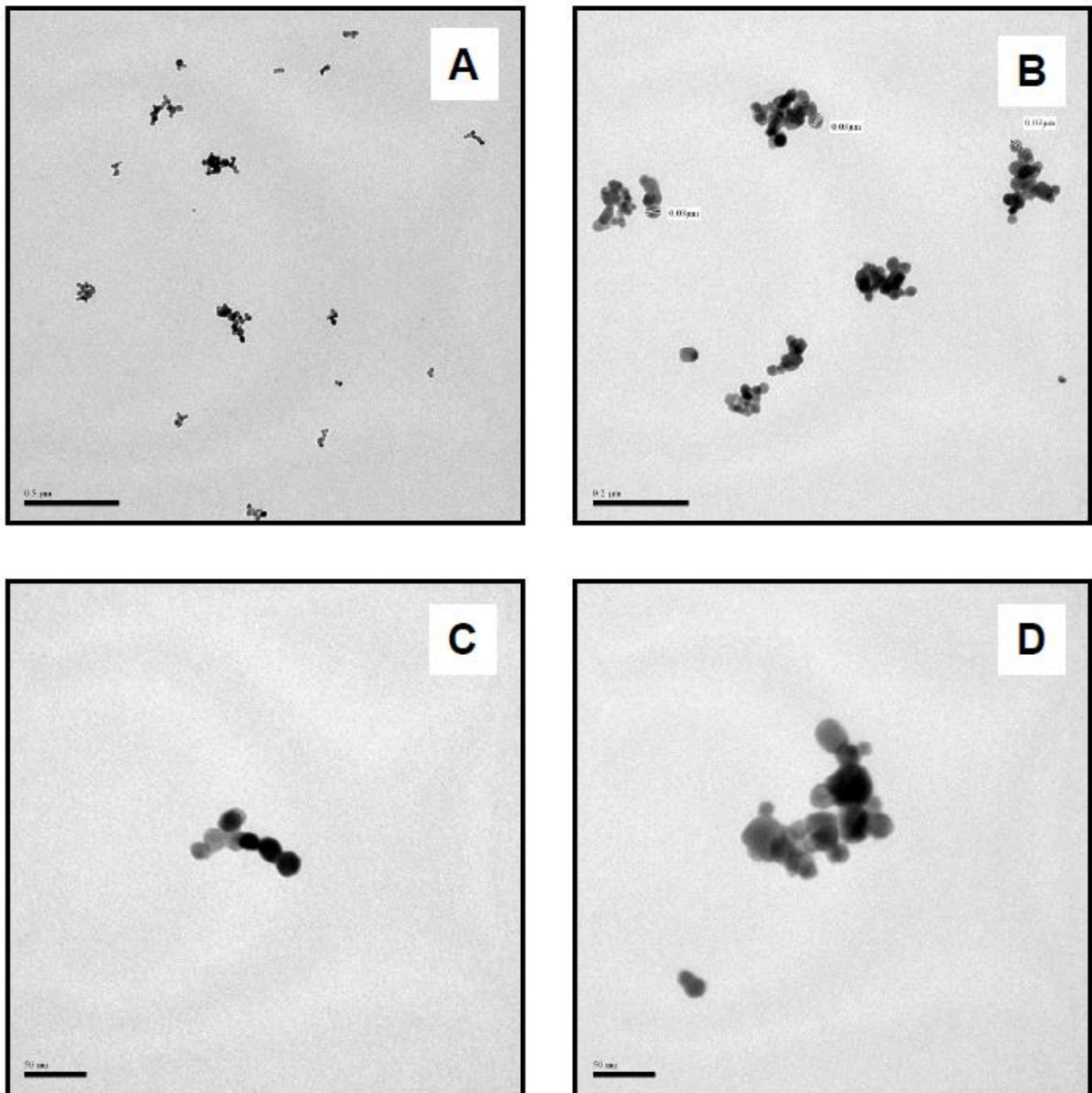
Gráfico 1 - Distribuição de tamanho das CuO-NPs analisadas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: (Do autor, 2018).

Os ensaios foram realizados utilizando 1 mL de suspensão de CuO-NPs $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, aplicada sobre grade de cobre revestida por formvar e contrastadas com uranila recém centrifugada. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1230 e analisadas em software ImageJ.

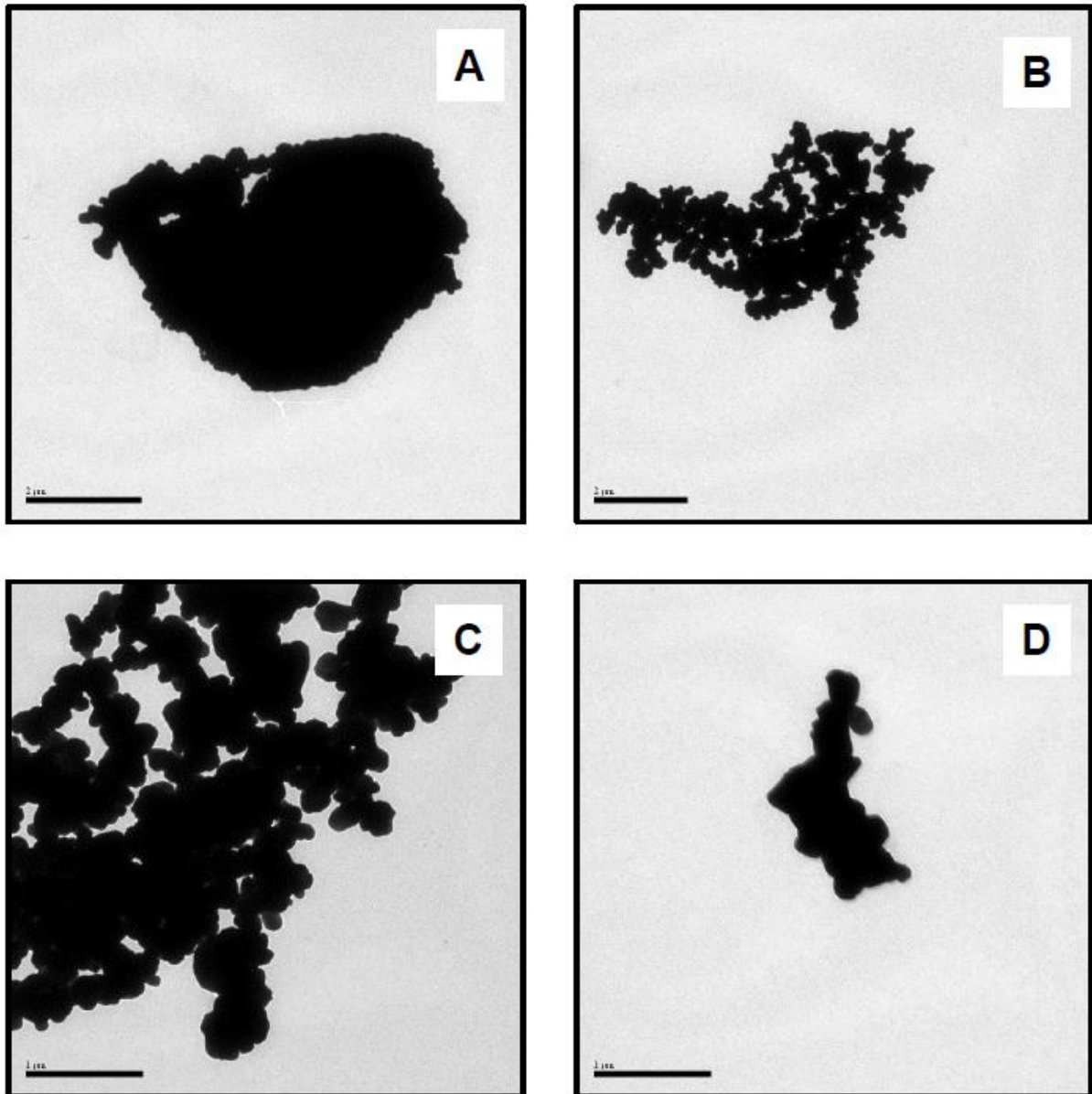
Figura 2 - Eletromicrografias de CuO-NPs.



Fonte: (Do autor, 2018).

A: Escala 1,0 cm:0,5 μm . B: Escala 1,0 cm:0,2 μm . C: Escala 1,0 cm:50 nm. D: Escala 1,0 cm:50 nm. Análise realizada utilizando 1 mL de suspensão de CuO-NPs $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, aplicada sobre grade de cobre revestida por formvar e contrastadas com uranila recém centrifugada. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1230 e analisadas em software ImageJ.

Figura 3 - Eletromicrografias de CuO-MPs.



Fonte: (Do autor, 2018).

A: Escala 1,0 cm:2,0 μm . B: Escala 1,0 cm:2,0 μm . C: Escala 1 cm:1,0 μm . D: Escala 1 cm:1,0 μm . Análise realizada utilizando 1 mL de suspensão de CuO-MPs $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, aplicada sobre grade de cobre revestida por formvar e contrastadas com uranila recém centrifugada. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1230 e analisadas em software ImageJ.

5.1.3 Tamanho das CuO-NPs em diferentes valores de pH do trato gastrointestinal

Os valores encontrados em todos os pH estudados, e na água ultrapura para fins de comparação, encontram-se descritos na Tabela 1. O Gráfico 1 refere-se à curva de dispersão dos tamanhos das CuO-NPs gerada em cada suspensão.

Na análise do tamanho de partícula das CuO-NPs utilizando diferentes meios de dispersão, foi possível observar que, com a alteração do pH do meio, as nanopartículas alteravam seu tamanho e potencial Zeta, de forma que, quanto mais elevado o pH, maior eram as partículas e menor era o potencial – para o pH 7,2, por exemplo, as CuO-NPs apresentaram tamanho médio de 1,57 μm e potencial Zeta médio de -46,20 mV, valores muito diferentes dos encontrados quando o meio dispersante utilizado foi a água ultrapura (vide item 4.1.1).

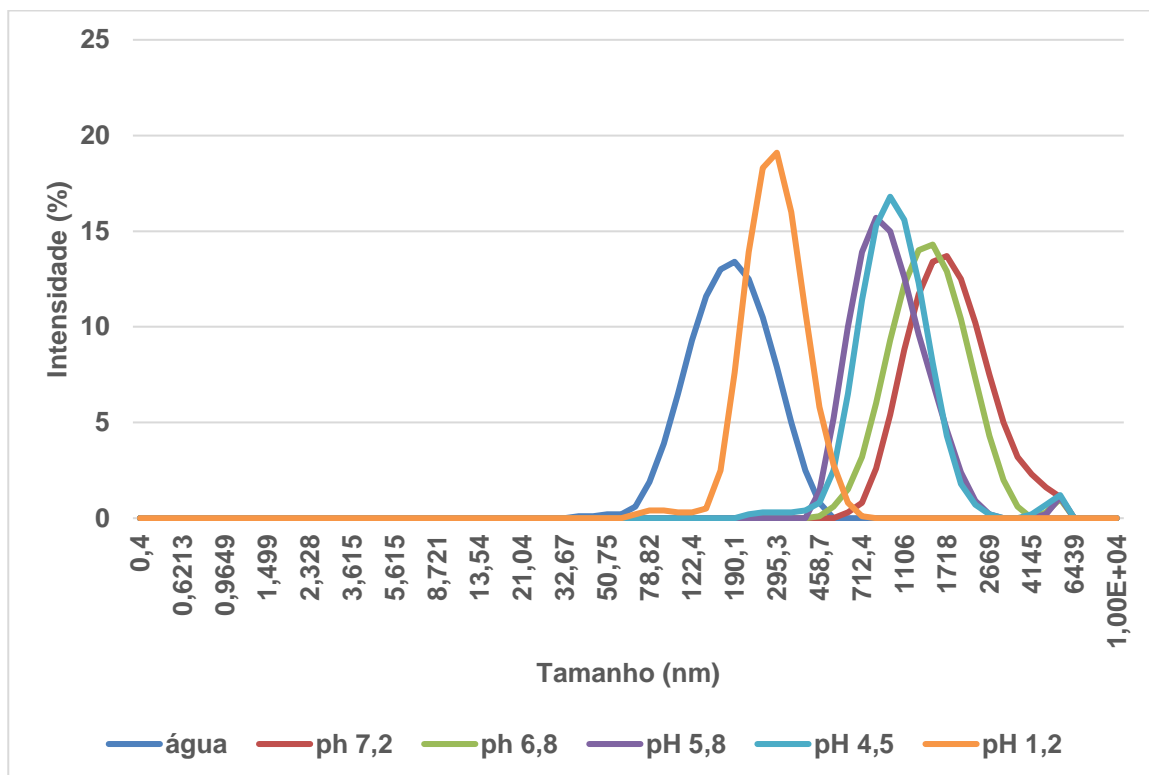
Tabela 1 - Tamanho de partícula, Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta de CuO-NPs, medidos em diferentes valores de pH

Meio dispersante	Tamanho de Partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Água Ultrapura	166,9 ± 2,54	0,169	16,70 ± 0,86
pH 1,2	313,3 ± 7,37	0,257	38,30 ± 0,89
pH 4,5	1033,0 ± 123,80	0,233	-0,36 ± 0,57
pH 5,8	1017,0 ± 163,90	0,273	-26,40 ± 1,55
pH 6,8	1339,0 ± 200,00	0,252	-36,70 ± 1,85
pH 7,2	1571,0 ± 134,00	0,278	-46,20 ± 6,71

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n = 5 medidas por meio dispersante)

Fonte: (Do autor, 2017).

Gráfico 2 - Dispersão de tamanho em nm das CuO-NPs nos diferentes valores de pH estudados e na água ultrapura.



Fonte: (Do autor, 2017).

Os ensaios foram realizados utilizando uma suspensão mãe de CuO-NPs, que foi diluída com tampões de cada pH estudado, ou água. A presença de picos únicos demonstra a ocorrência de sistemas monodispersos.

5.2 Avaliação dos sinais clínicos

Na avaliação dos sinais clínicos em ratos Wistar fêmeas, não foram observadas alterações na maioria dos padrões estabelecidos. A única alteração encontrada foi na coloração e consistência das fezes do grupo tratado com CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Nesse caso, estas apresentavam aspecto negro brilhoso e estavam amolecidas, diferente das demais, que se encontravam marrons e rígidas – tanto grupo controle quanto outras doses testadas. O resultado encontra-se resumido na Tabela 2. Não ocorreram óbitos durante os 14 dias de observação.

Tabela 2 - Resultado da Avaliação dos Sinais Clínicos¹, em ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs² e CuO-MPs³.

	Controle⁴	5 mg.kg⁻¹	50 mg.kg⁻¹	300 mg.kg⁻¹	2000 mg.kg⁻¹
CuO-NPs	Sem alterações.	Sem alterações.	Sem alterações.	Sem alterações.	Fezes alteradas.
	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.
CuO-MPs	Sem alterações.	Sem alterações.	Sem alterações.	Sem alterações.	Sem alterações.
	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.	Sem óbitos.

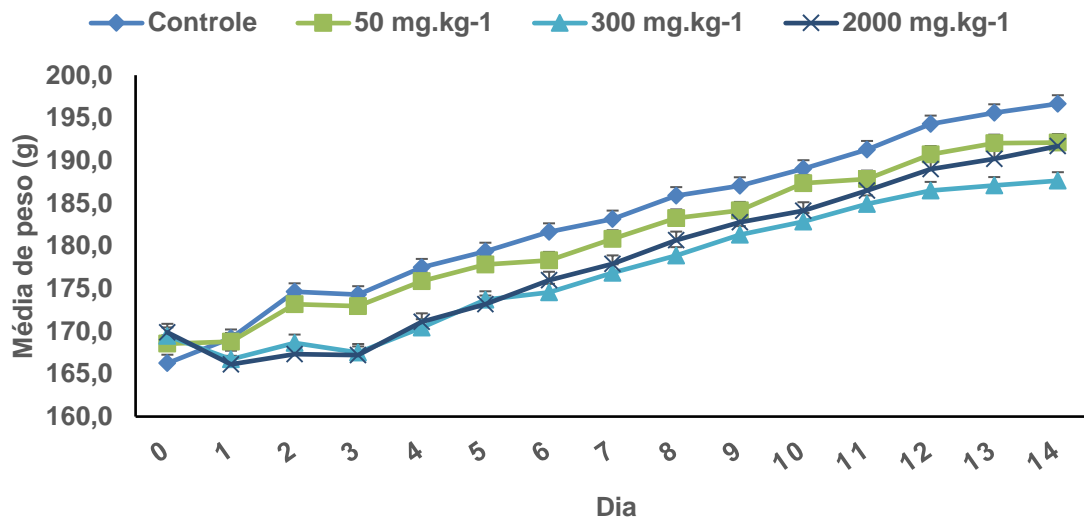
¹Sinais clínicos avaliados: exploração; frêmito vocal; resposta ao toque; ataxia; piloereção; defecação. ²Nanopartículas de óxido de cobre; ³Micropartículas de óxido de cobre; ⁴Água ultrapura.

Fonte: (Do autor, 2017).

5.3 Avaliação do ganho de peso diário

Na avaliação do ganho de peso final, todos os animais dos grupos experimentais e do grupo controle ganharam peso de forma similar. A evolução do ganho de peso está demonstrada nos Gráficos 2 e 3, para os animais tratados com as CuO-NPs e as CuO-MPs, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso final dos animais dos grupos experimentais e em relação aos dos grupos controle ($p > 0,05$).

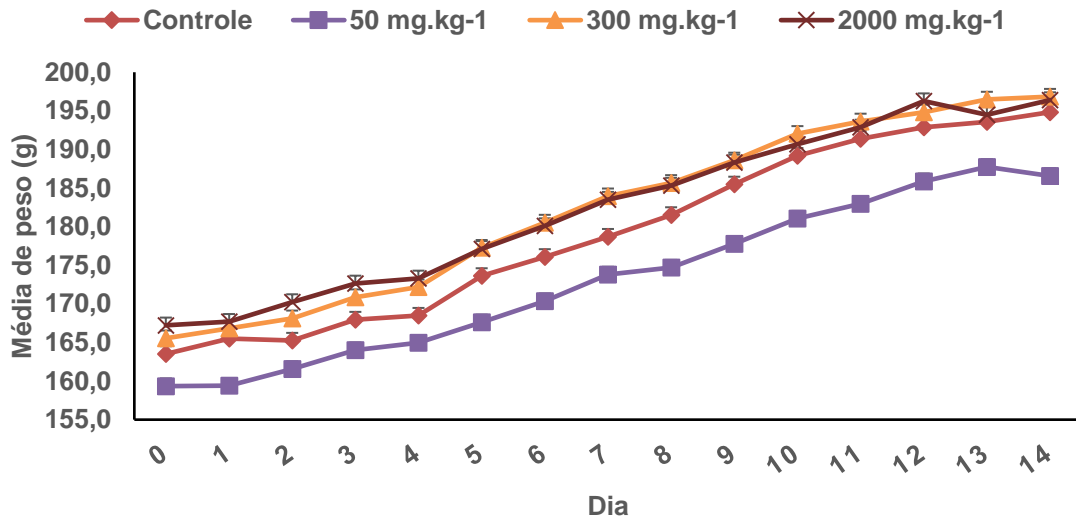
Gráfico 3 - Peso de Ratos Wistar de sexo feminino, ao longo de 14 dias de observação após a administração oral em dose única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

Os animais foram pesados diariamente, sempre no mesmo horário. Os resultados apresentados no gráfico representam a média do peso diário de cada grupo, com seu respectivo desvio padrão, com $n = 10$ em todos os grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).
¹Nanopartículas de óxido de cobre.

Gráfico 4 - Peso de Ratos Wistar de sexo feminino, ao longo de 14 dias de observação após a administração oral em dose única de CuO-MPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

Os animais foram pesados diariamente, sempre no mesmo horário. Os resultados apresentados no gráfico representam a média do peso diário de cada grupo, com seu respectivo desvio padrão, com $n = 10$ em todos os grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).
¹Micropartículas de óxido de cobre.

5.3 Avaliação da ingestão alimentar diária

Na avaliação da ingestão alimentar, foi observado que quase todos os animais dos grupos experimentais e controle ingeriram o alimento ofertado de forma similar. A única exceção foi o grupo dos animais tratados com CuO-NPs na dose de 2000 mg.kg⁻¹, cuja ingestão alimentar foi inferior aos demais, somente no primeiro dia após a administração, e o resultado encontrado foi estatisticamente significativo, com p valor = 0,014. Os valores médios e seus respectivos desvios padrões para cada dia estão contidos na Tabela 3 no caso dos animais tratados com CuO-NPs e na Tabela 4 para os tratados com CuO-MPs.

Tabela 3 - Consumo diário de alimento, em gramas, por ratos Wistar de sexo feminino ao longo de 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹.

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
Controle²	16,41	± 1,66	19,01	± 1,12	18,05	± 0,66	20,46	± 1,12	22,75	± 1,15
50 mg.kg-1	13,96	± 1,85	17,37	± 1,65	16,50	± 0,78	18,95	± 0,60	22,69	± 1,40
300 mg.kg-1	10,74	± 1,64	14,69	± 1,27	14,02	± 1,30	17,20	± 1,82	22,47	± 1,91
2000 mg.kg-1	8,38	± 1,44*	14,25	± 1,91	13,30	± 1,27	17,66	± 1,10	23,00	± 1,93
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
Controle²	20,51	± 0,84	19,01	± 0,83	20,06	± 0,87	19,26	± 0,54	20,03	± 0,58
50 mg.kg-1	18,97	± 0,55	17,91	± 1,07	18,80	± 0,39	19,02	± 0,64	18,97	± 0,54
300 mg.kg-1	18,37	± 0,86	17,85	± 0,58	17,36	± 0,36	17,85	± 0,45	18,49	± 0,48
2000 mg.kg-1	18,34	± 1,04	18,17	± 0,69	18,48	± 0,64	19,29	± 0,68	19,52	± 0,80
	Dia 11		Dia 12		Dia 13		Dia 14			
Controle²	20,33	± 1,34	20,47	± 1,02	20,60	± 0,97	19,62	± 0,98		
50 mg.kg-1	17,74	± 0,64	17,66	± 1,10	18,41	± 1,21	17,60	± 0,76		
300 mg.kg-1	18,18	± 0,93	17,71	± 1,21	17,41	± 1,00	17,29	± 0,75		
2000 mg.kg-1	18,89	± 0,89	19,08	± 0,92	18,83	± 0,96	18,73	± 0,62		

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=10 por grupo experimental)

* Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de medidas repetidas.

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Água ultrapura.

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 4 - Consumo diário de alimento, em gramas, por ratos Wistar de sexo feminino ao longo de 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-MPs¹.

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Dia 4		Dia 5	
Controle²	17,35	± 0,93	14,48	± 0,78	16,57	± 0,73	16,86	± 0,81	18,09	± 0,80
50 mg.kg-1	15,93	± 0,54	15,11	± 0,54	16,73	± 0,75	17,39	± 0,45	16,72	± 0,77
300 mg.kg-1	17,02	± 0,27	14,67	± 0,77	17,01	± 0,70	18,41	± 0,72	19,20	± 0,99
2000 mg.kg-1	15,88	± 0,46	15,88	± 0,67	16,87	± 0,51	17,74	± 0,63	17,99	± 0,71
	Dia 6		Dia 7		Dia 8		Dia 9		Dia 10	
Controle²	18,51	± 0,57	18,70	± 0,57	19,56	± 0,47	19,16	± 0,62	21,35	± 1,33
50 mg.kg-1	18,44	± 0,50	18,17	± 0,55	17,94	± 0,70	17,96	± 0,65	22,72	± 1,14
300 mg.kg-1	19,81	± 0,80	19,38	± 0,49	19,49	± 0,88	18,83	± 0,68	18,68	± 1,06
2000 mg.kg-1	19,37	± 0,39	19,19	± 0,61	19,72	± 0,47	18,59	± 0,42	19,08	± 1,31
	Dia 11		Dia 12		Dia 13		Dia 14			
Controle²	17,33	± 1,02	19,17	± 0,67	19,21	± 0,74	18,69	± 0,65		
50 mg.kg-1	16,96	± 0,61	18,81	± 1,27	17,77	± 0,79	18,38	± 0,60		
300 mg.kg-1	19,74	± 1,37	18,56	± 0,92	19,47	± 0,75	17,88	± 0,47		
2000 mg.kg-1	17,31	± 0,76	18,54	± 0,89	19,04	± 0,64	18,62	± 0,54		

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=10 por grupo experimental)

Sem diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA de medidas repetidas.

¹Micropartículas de óxido de cobre; ²Água ultrapura.

Fonte: (Do autor, 2017).

5.4 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Na avaliação dos parâmetros hematológicos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e os grupos experimentais ($p > 0,05$). Porém, em todos os grupos de animais, tanto no caso das CuO-NPs quanto das CuO-MPs, bem como nos respectivos grupos controle, foram encontrados valores fora da faixa de referência enviada pelo ICTB juntamente aos resultados das análises, para os parâmetros de hemoglobina (HGB) e plaquetas (Plaq). Os valores médios e seus desvios padrões estão contidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação hematológica de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs².

	Valores de Referência				Controle ³	50 mg.kg ⁻¹	300 mg.kg ⁻¹	2000 mg.kg ⁻¹
		±						
Hemácias (milhões/mm ³)	8,50	±	0,30	N	8,64 ± 0,65	8,10 ± 1,01	8,63 ± 0,65	8,51 ± 0,84
				M	7,85 ± 0,17	8,50 ± 0,25	8,16 ± 0,17	8,24 ± 0,11
HGB (g/dL)	8,50	±	0,50	N	17,29 ± 1,23	16,44 ± 1,47	17,14 ± 1,01	17,31 ± 1,45
				M	16,01 ± 0,30	16,77 ± 0,41	16,46 ± 0,38	16,80 ± 0,28
Hct (%)	47,40	±	7,20	N	51,11 ± 3,00	47,93 ± 5,40	50,66 ± 2,57	51,27 ± 3,81
				M	47,57 ± 1,04	49,77 ± 1,41	48,26 ± 1,16	48,63 ± 0,78
VCM (μ ³)	57,50	±	1,90	N	59,26 ± 2,00	59,33 ± 2,21	58,84 ± 1,95	60,36 ± 2,01
				M	60,75 ± 1,56	58,61 ± 0,47	59,11 ± 0,27	59,03 ± 0,52
HCM (pg)	19,00	±	0,90	N	19,98 ± 0,47	20,42 ± 1,08	19,90 ± 0,52	20,37 ± 0,56
				M	20,41 ± 0,26	19,79 ± 0,20	20,16 ± 0,12	20,39 ± 0,25
HCMC (g/dL)	33,10	±	0,80	N	33,81 ± 0,67	34,40 ± 1,19	33,84 ± 0,46	33,73 ± 0,50
				M	33,69 ± 0,41	33,73 ± 0,18	34,13 ± 0,14	34,57 ± 0,15
Leuco (mil/mm ³)	6,70	±	2,60	N	6,89 ± 2,97	4,19 ± 1,91	4,36 ± 1,68	4,43 ± 2,13
				M	5,76 ± 0,59	5,04 ± 1,02	4,43 ± 0,70	5,89 ± 0,68
Plaq (mil/mm ³)	601,60	±	192,00	N	1119,56 ± 170,53	1016,89 ± 190,28	925,43 ± 296,89	1132,44 ± 271,84
				M	937,71 ± 95,53	1115,43 ± 77,63	1133,29 ± 70,28	1018,57 ± 86,92

N = Animais tratados com CuO-NPs; M = Animais tratados com CuO-MPs; HGB, Hemoglobina; Hct, Hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; HCMC, concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuco, Leucócitos Totais; Plaq, Plaquetas.

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura. Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=10 por grupo experimental).

Fonte: (Do autor, 2017).

5.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos referentes a proteínas e enzimas, no caso das CuO-NPs, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle, somente para a enzima aspartato-aminotransferase (AST) do grupo 2000 mg.kg⁻¹, de acordo com o teste de Bonferroni, com $p = 0,041$. O mesmo valor também se encontrou fora da faixa de referência enviada pelo ICTB. Os valores de creatinina cinase dos grupos controle e 50 mg.kg⁻¹ também se encontraram fora da faixa de referência. Estes resultados encontram-se descritos na Tabela 6.

No caso dos parâmetros bioquímicos referentes a nutrientes, para os grupos tratados com CuO-MPs, foram observadas diferenças estatisticamente significantes, de acordo como teste de Bonferroni, para o grupo 2000 mg.kg⁻¹ em relação ao grupo controle, no caso da glicose, com $p = 0,001$ e do fósforo, com $p = 0,002$. Estes resultados estão representados na Tabela 7.

Adicionalmente, em todos os grupos de animais, tanto no caso das CuO-NPs quanto das CuO-MPs, e nos seus respectivos controles, foram encontrados valores fora da faixa de referência enviada pelo ICTB juntamente aos resultados das análises, para os parâmetros de cloro, glicose e fosfatase alcalina. Os outros parâmetros estudados não apresentaram variação significativa em relação ao grupo controle ou a faixa de referência.

Tabela 6 - Avaliação bioquímica de enzimas e proteínas de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs².

	Valores de Referência			Controle ³	50 mg.kg ⁻¹	300 mg.kg ⁻¹	2000 mg.kg ⁻¹	
Creatinina (mg/dL)	0,05	a	0,65	N	0,62 ± 0,10	0,58 ± 0,11	0,51 ± 0,04	0,44 ± 0,05
				M	0,47 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,36 ± 0,04	0,43 ± 0,06
AST (U/L)	39,00	a	111,00	N	49,40 ± 8,34	39,70 ± 7,65	35,00 ± 5,54	25,40 ± 2,77 *
				M	31,78 ± 4,24	38,14 ± 5,54	28,25 ± 3,44	21,63 ± 3,04
ALT (U/L)	20,00	a	61,00	N	37,90 ± 4,54	37,67 ± 3,46	37,38 ± 4,05	38,33 ± 2,81
				M	35,67 ± 3,65	43,14 ± 2,85	36,88 ± 1,96	37,63 ± 3,56
CK (U/L)	48,00	a	340,00	N	339,10 ± 182,83	356,80 ± 166,01	213,75 ± 98,34	147,70 ± 98,49
				M	115,33 ± 47,93	152,00 ± 49,05	211,13 ± 41,61	209,13 ± 93,27
Fosfatase alcalina (U/L)	16,00	a	302,00	N	10,80 ± 0,55	10,80 ± 0,53	10,63 ± 0,63	10,00 ± 0,00
				M	10,22 ± 0,22	10,86 ± 0,86	10,38 ± 0,38	12,13 ± 1,39
Ptns (g/dL)	5,30	a	6,90	N	5,38 ± 0,07	5,23 ± 0,10	5,40 ± 0,08	5,25 ± 0,06
				M	5,13 ± 0,10	5,27 ± 0,11	5,45 ± 0,11	5,49 ± 0,11

N = Animais tratados com CuO-NPs; M = Animais tratados com CuO-MPs

AST, Aspartato Aminotransferase; ALT, Alanina Aminotransferase; CK, Creatinina Cinase; Ptns, Proteínas Totais

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=10 por grupo experimental)

*Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05): ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 7 - Avaliação bioquímica de sais, glicose e colesterol de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs².

	Valores de				Controle ³	50 mg.kg ⁻¹	300 mg.kg ⁻¹	2000 mg.kg ⁻¹
	Referência							
Sódio (mEq/L)	135,00	a	146,00	N	139,90 ± 0,86	140,10 ± 1,14	141,25 ± 0,94	141,70 ± 0,65
				M	143,56 ± 0,77	144,57 ± 0,90	145,38 ± 0,80	145,25 ± 0,92
Cloro (mmol/L)	96,00	a	107,00	N	84,90 ± 1,43	87,80 ± 1,44	86,75 ± 1,35	89,80 ± 0,53
				M	90,67 ± 1,35	91,86 ± 0,63	93,00 ± 1,09	91,25 ± 0,56
Glicose (mg/dL)	50,00	a	135,00	N	190,00 ± 11,45	152,70 ± 3,94	201,75 ± 19,08	148,80 ± 10,99
				M	156,44 ± 10,22	199,57 ± 18,45	185,63 ± 10,64	236,13 ± 15,78*
Fosforo (mg/dL)	5,80	a	11,20	N	6,50 ± 0,49	5,48 ± 0,35	7,90 ± 0,59	7,63 ± 0,67
				M	7,82 ± 0,27	8,83 ± 0,39	8,96 ± 0,35	9,84 ± 0,49*
Colesterol (mg/dL)	20,00	a	92,00	N	47,40 ± 1,66	47,30 ± 2,19	47,13 ± 1,37	50,89 ± 3,09
				M	48,33 ± 2,21	47,14 ± 1,39	53,50 ± 4,50	50,13 ± 3,07

N = Animais tratados com CuO-NPs; M = Animais tratados com CuO-MPs

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura.

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=10 por grupo experimental)

*Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05): ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

Fonte: (Do autor, 2017).

5.6 Avaliação anatomopatológica

Durante o exame anatomopatológico, não foram encontradas alterações macroscópicas nos rins, baço, fígado e cérebro dos animais administrados com as CuO-NPs e as CuO-MPs, nem nos grupos controle (água ultrapura), conforme apresentado na Tabela 8. Os órgãos analisados estavam nas posições fisiológicas esperadas, com aspecto e coloração normais.

Tabela 8 - Resultados anatomopatológicos do exame macroscópico em órgãos de ratos Wistar do sexo feminino, 14 dias após administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs².

	Controle ³	50 mg.kg ⁻¹	300 mg.kg ⁻¹	2000 mg.kg ⁻¹
CuO-NPs¹				
Rins	N	N	N	N
Baço	N	N	N	N
Fígado	N	N	N	N
Cérebro	N	N	N	N
CuO-MPs²				
Rins	N	N	N	N
Baço	N	N	N	N
Fígado	N	N	N	N
Cérebro	N	N	N	N

N = Não foram observadas alterações anatomopatológicas
(n = 10 animais por grupo experimental)

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura.
Fonte: (Do autor, 2017).

5.7 Avaliação dos pesos dos órgãos isolados

Após a avaliação macroscópica, os órgãos selecionados no item 4.3.6 foram retirados e pesados. Não foram observadas alterações nos pesos absolutos dos órgãos analisados. Os resultados da pesagem se encontram descritos na tabela 9 para os animais tratados com CuO-NPs e CuO-MPs.

Tabela 9 - Peso absoluto, em gramas, de órgãos isolados de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs².

	Controle ³	50 mg.kg ⁻¹	300 mg.kg ⁻¹	2000 mg.kg ⁻¹
CuO-NPs¹				
Rins	2,01 ± 0,09	1,84 ± 0,04	1,85 ± 0,05	1,84 ± 0,05
Baço	0,70 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,65 ± 0,03
Fígado	7,84 ± 0,26	7,52 ± 0,16	7,68 ± 0,27	7,61 ± 0,16
Cérebro	2,05 ± 0,03	2,07 ± 0,03	2,01 ± 0,02	2,02 ± 0,03
CuO-MPs²				
Rins	1,92 ± 0,06	1,93 ± 0,04	1,98 ± 0,04	1,91 ± 0,04
Baço	0,72 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,69 ± 0,03	0,72 ± 0,03
Fígado	7,89 ± 0,24	7,98 ± 0,28	8,63 ± 0,18	8,54 ± 0,10
Cérebro	2,05 ± 0,03	2,04 ± 0,03	2,00 ± 0,03	2,03 ± 0,04

Os dados foram expressos em média ± Erro padrão da média (n=10 por grupo experimental)

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura.

Fonte: (Do autor, 2017).

5.8 Avaliação histopatológica dos órgãos selecionados

Os achados histológicos para os fígados dos ratos Wistar de sexo feminino tratados com CuO-NPs e CuO-MPs se encontram resumidos na Tabela 10. As Figuras 2 e 3 apresentam as fotomicrografias referentes ao fígado de um animal de cada grupo tratado com CuO-NPs, sendo (A) grupo controle, (B) 50 mg.kg⁻¹, (C) 300 mg.kg⁻¹ e (D) 2000 mg.kg⁻¹. Nas Figura 4 e 5, encontram-se as fotomicrografias dos fígados dos animais tratados com CuO-MPs, seguindo a mesma lógica em ambas as imagens. Não foram notadas diferenças significativas, para a maioria dos achados histológicos, entre os controles e os grupos de animais tratados com CuO-NPs ou CuO-MPs, com exceção da megalocitose, que não foi observada nos grupos controle.

Tabela 10 - Análise histopatológica do fígado de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs².

CuO-NPs¹	Controle³	50 mg.kg⁻¹	300 mg.kg⁻¹	2000 mg.kg⁻¹
Sinusóides dilatados	+	+	+	+
Hiperemia portal	++	++	++	++
Binucleação	++	++	++	++
Degeneração vacuolar intracitoplasmática	+	+	+	+
Megalocitose	-	+	+	+

CuO-MPs²	Controle	50 mg.kg⁻¹	300 mg.kg⁻¹	2000 mg.kg⁻¹
Sinusóides dilatados	+	+	+	+
Hiperemia portal	++	++	++	++
Binucleação	++	++	++	++
Degeneração vacuolar intracitoplasmática	+	+	+	+
Megalocitose	-	+	+	+

- : Ausência

+ : Discreto

++ : Moderado

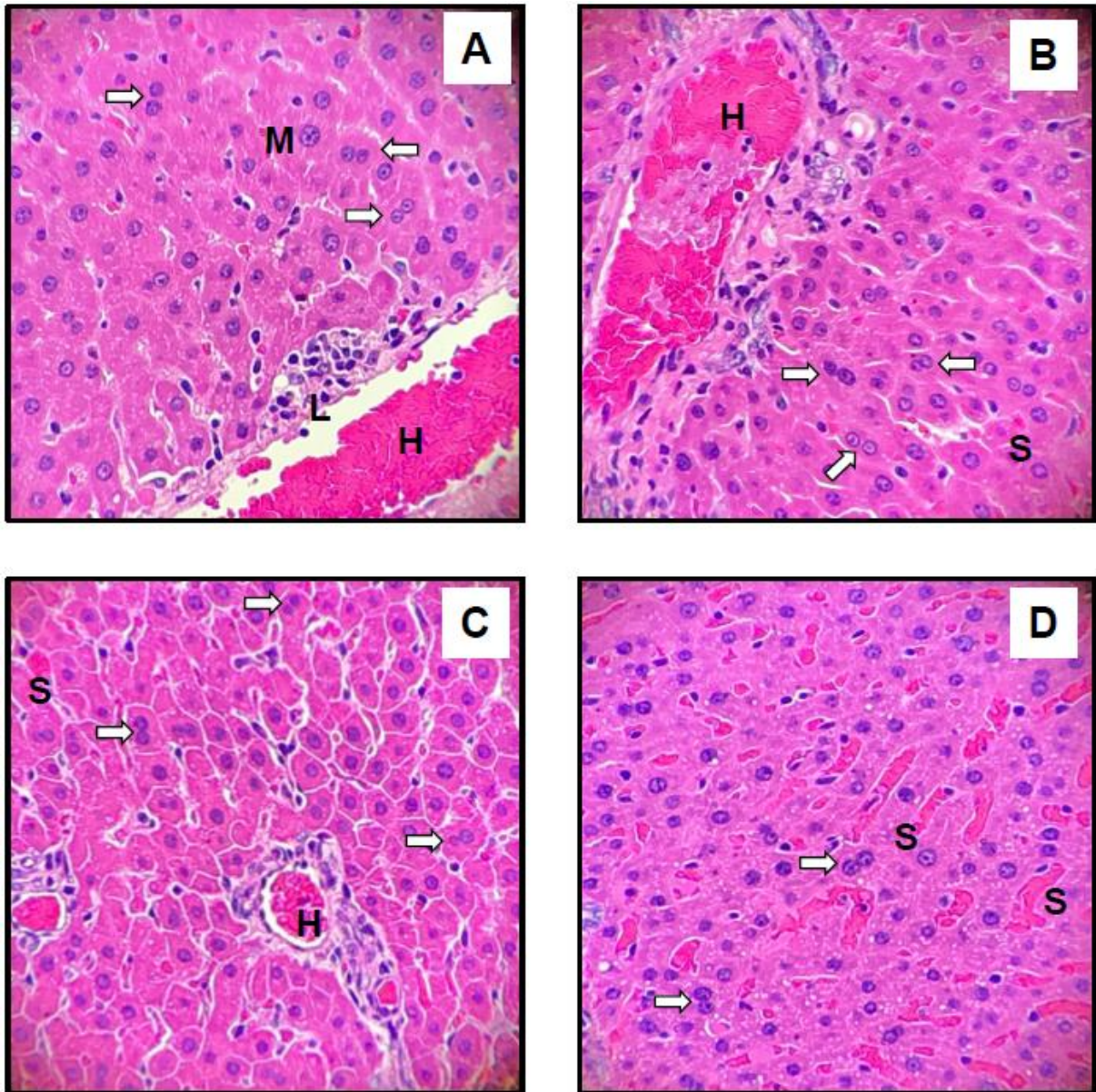
* : Resultados diferentes em relação ao respectivo grupo controle

Os resultados estão expressos em média de achados em triplicata de órgãos analisados

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura.

Fonte: (Do autor, 2017).

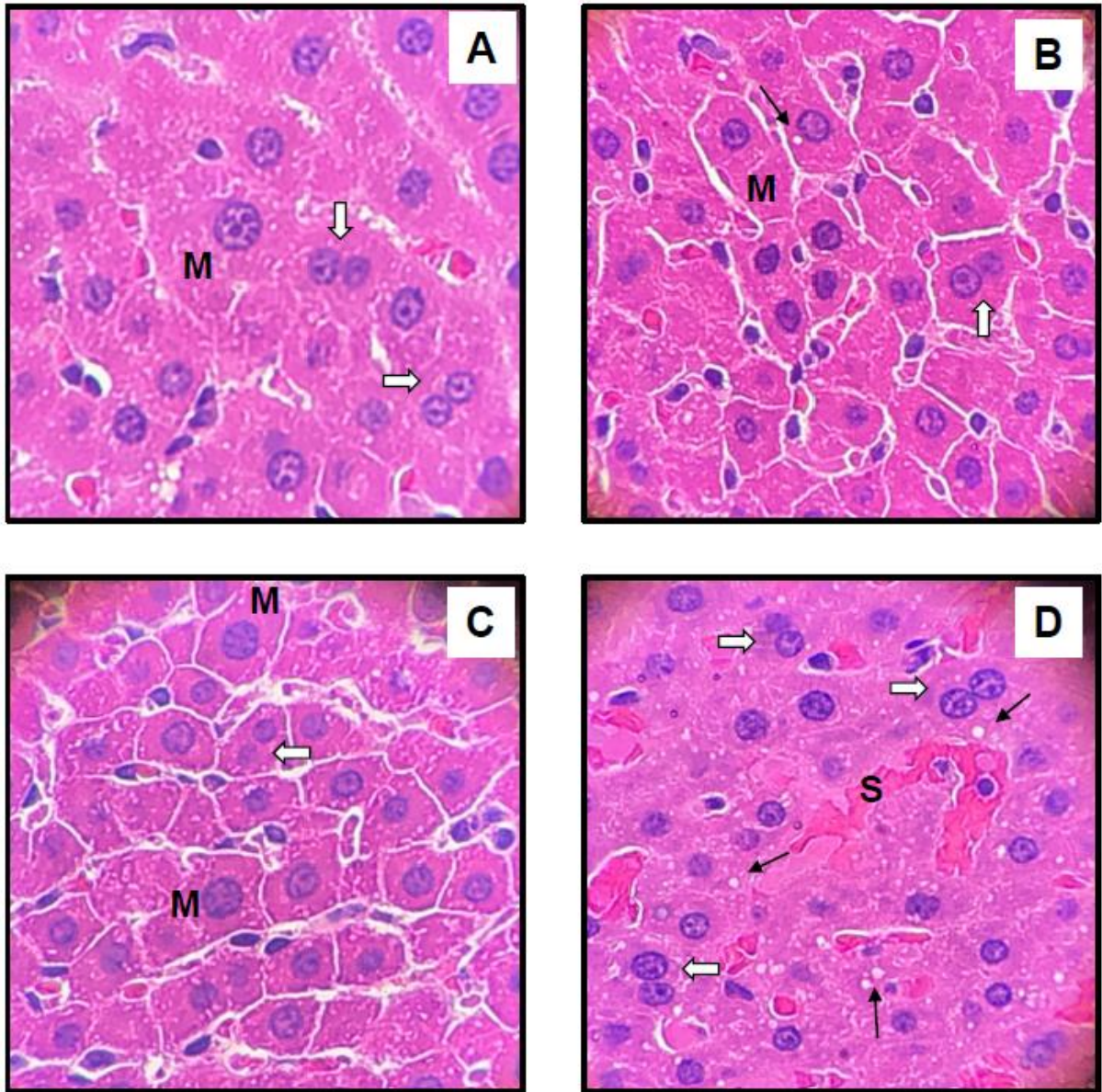
Figura 4 - Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-NPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-NPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 200x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: H = hiperemia portal; L = foco de linfócitos; M = megalocitose; S = sinusóides dilatados; Setas brancas = binucleação.
¹Nanopartículas de óxido de cobre.

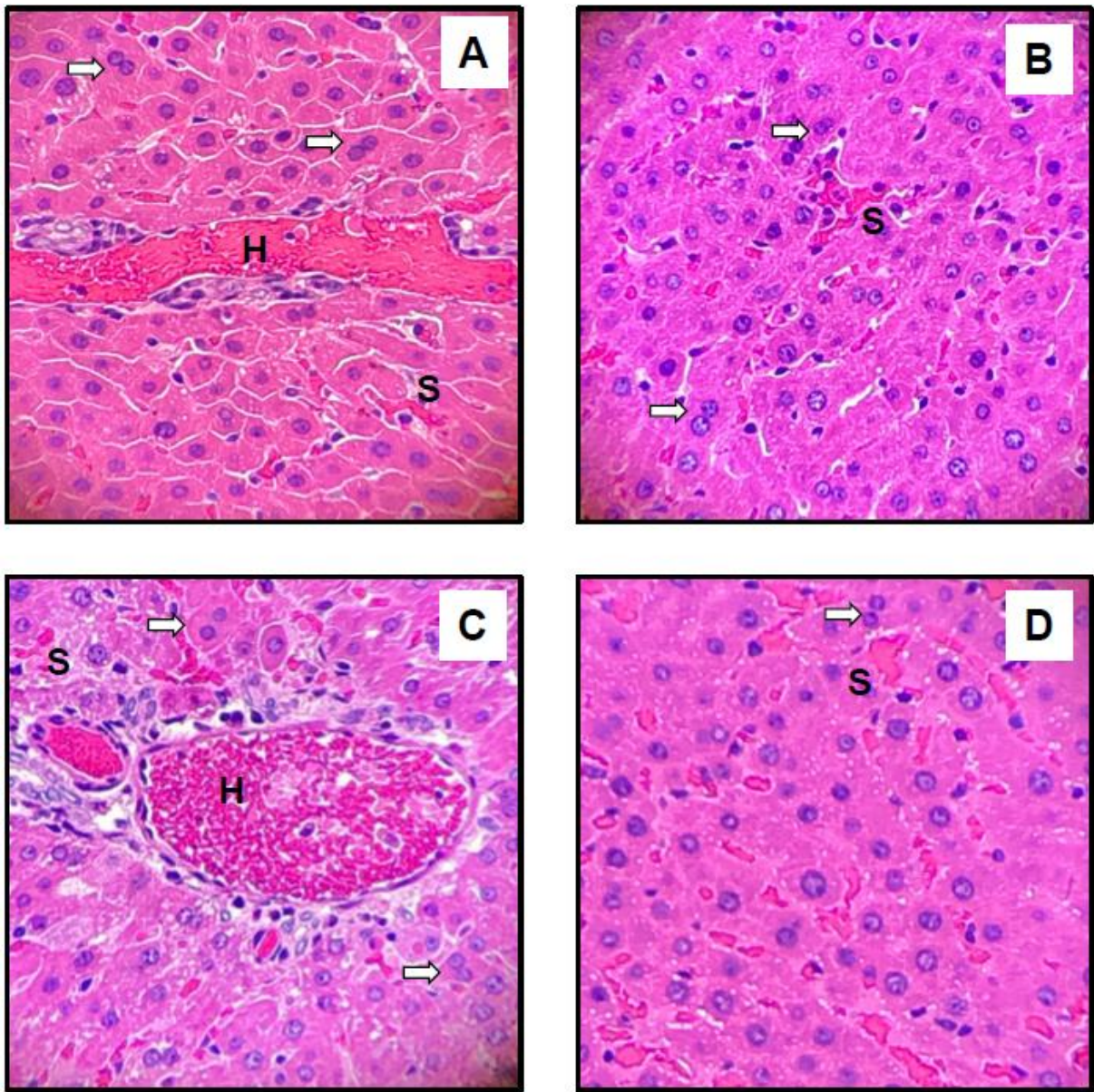
Figura 5 - Fotomicrografias (400x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-NPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-NPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 400x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: M = megalocitose; S = sinusóides dilatados; Setas brancas = binucleação; Setas pretas = degeneração vacuolar intracitoplasmática. ¹Nanopartículas de óxido de cobre.

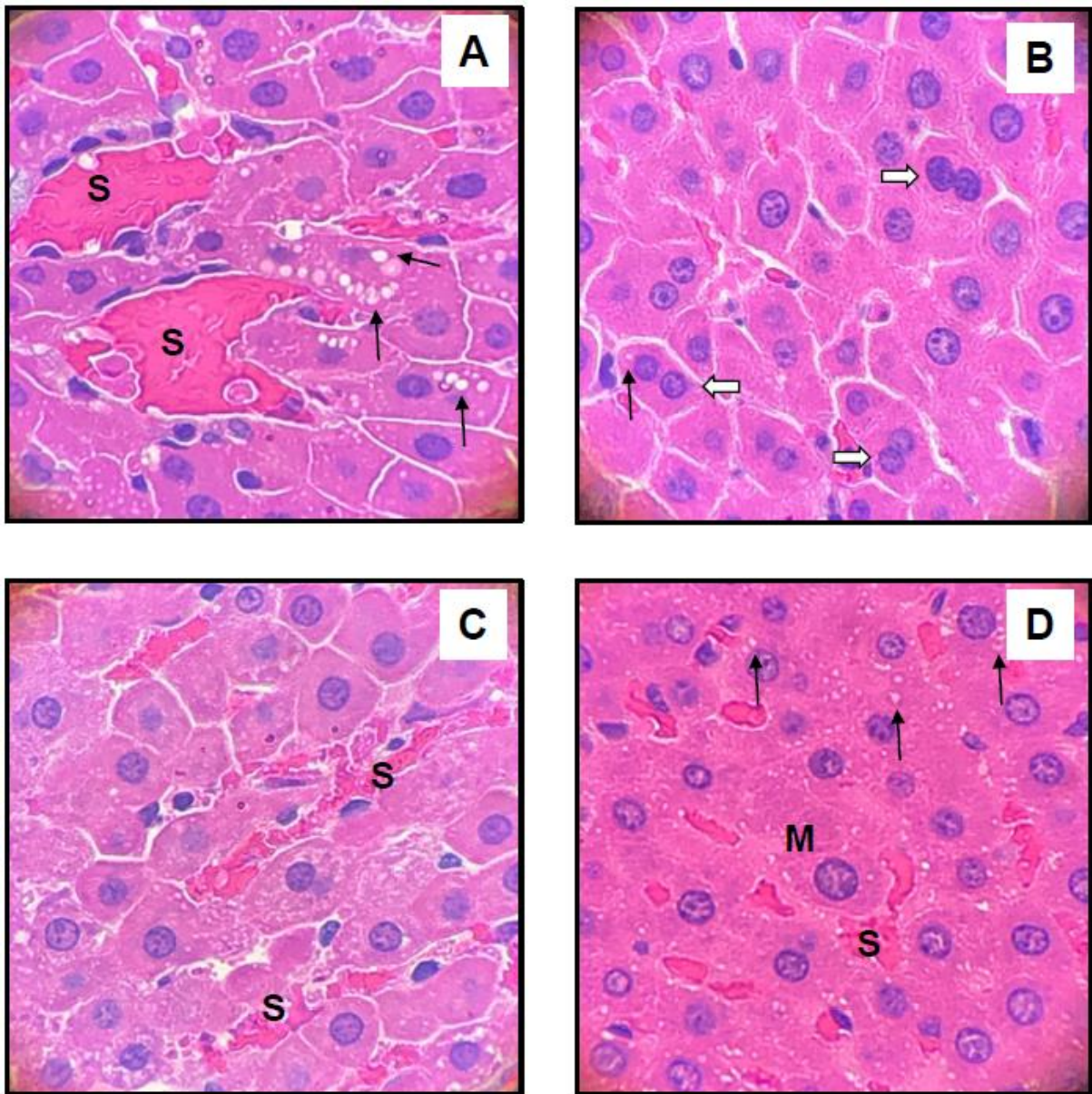
Figura 6 - Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-MPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-MPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-MPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 200x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: H = hiperemia portal; S = sinusóides dilatados; Setas brancas = binucleação. ¹Micropartículas de óxido de cobre.

Figura 7 - Fotomicrografias (400x) de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-MPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-MPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-MPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 400x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: M = megacitose; S = sinusóides dilatados; Setas brancas = binucleação; Setas pretas = degeneração vacuolar intracitoplasmática. ¹Micropartículas de óxido de cobre.

Os achados histológicos para os rins dos ratos Wistar tratados com CuO-NPs e CuO-MPs se encontram resumidos na Tabela 11. As Figuras 6 e 7 apresentam as fotomicrografias referentes aos rins de um animal de cada grupo tratado com CuO-NPs, sendo (A) grupo controle, (B) 50 mg.kg⁻¹, (C) 300 mg.kg⁻¹ e (D) 2000 mg.kg⁻¹. Nas Figuras 8 e 9, temos as micrografias dos rins dos animais tratados com CuO-MPs, seguindo a mesma lógica de distribuição da imagem. Não foram notadas diferenças significativas entre os controles e os grupos de animais tratados com CuO-NPs ou CuO-MPs.

Tabela 11 - Análise histopatológica dos rins de ratos Wistar de sexo feminino, 14 dias após a administração oral com dose única de CuO-NPs¹ ou CuO-MPs²

CuO-NPs¹	Controle³	50 mg.kg⁻¹	300 mg.kg⁻¹	2000 mg.kg⁻¹
Hiperemia cortical e medular	S	S	S	S
Mineralização na luz dos túbulos renais entre cortical e medular	+	+	+	+

CuO-MPs²	Controle³	50 mg.kg⁻¹	300 mg.kg⁻¹	2000 mg.kg⁻¹
Hiperemia cortical e medular	S	S	S	S
Mineralização na luz dos túbulos renais entre cortical e medular	+	+	+	+

- : Ausência

+ : Discreto

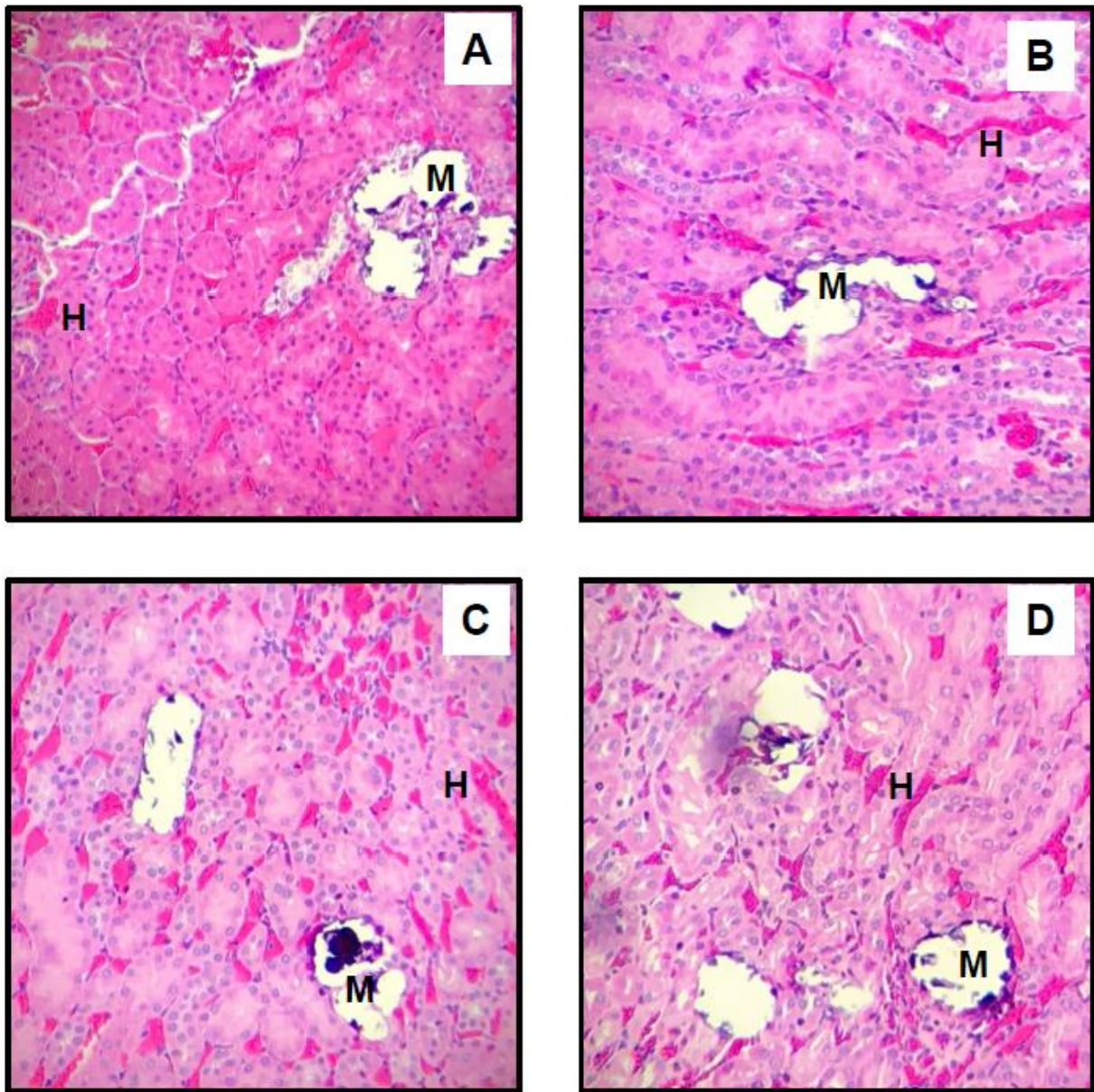
S : Sim

¹Nanopartículas de óxido de cobre; ²Micropartículas de óxido de cobre; ³Água ultrapura.

Os resultados estão expressos em média de achados em triplicata de órgãos analisados

Fonte: (Do autor, 2017).

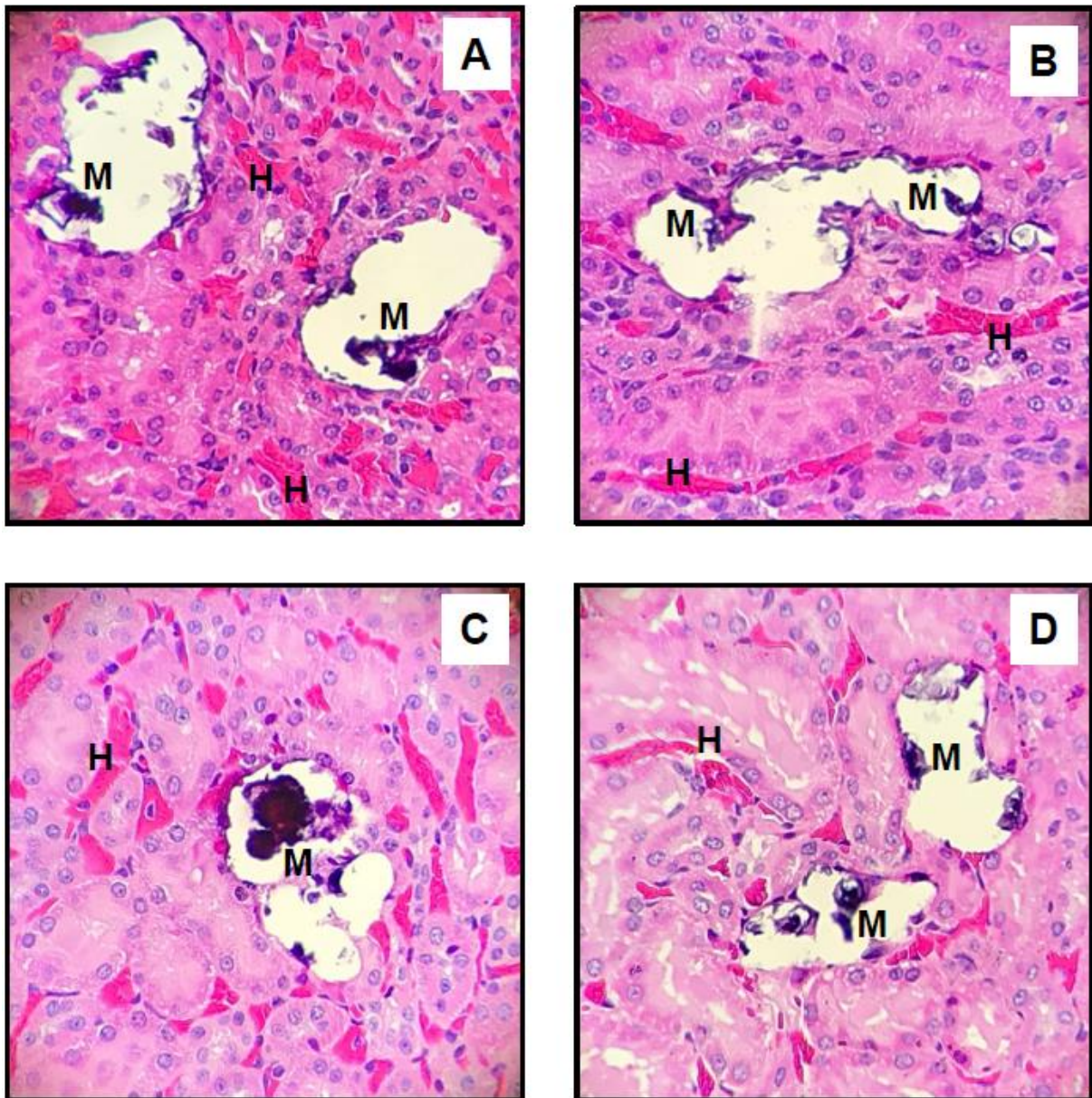
Figura 8 - Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-NPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-NPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 100x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: H = hiperemia; M = mineralização na luz tubular. ¹Nanopartículas de óxido de cobre.

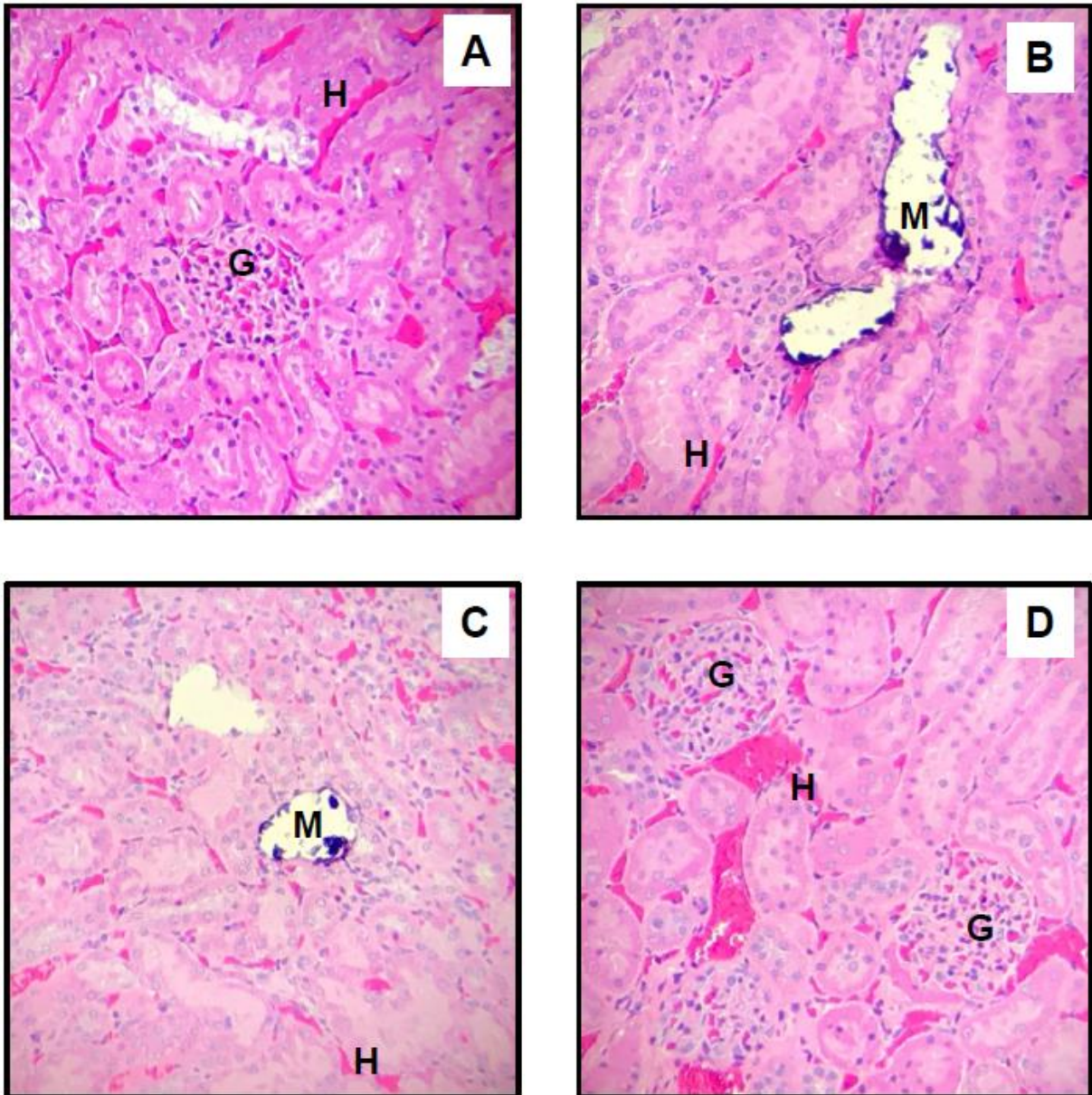
Figura 9 - Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-NPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-NPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 200x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: H = hiperemia; M = mineralização na luz tubular. ¹Nanopartículas de óxido de cobre.

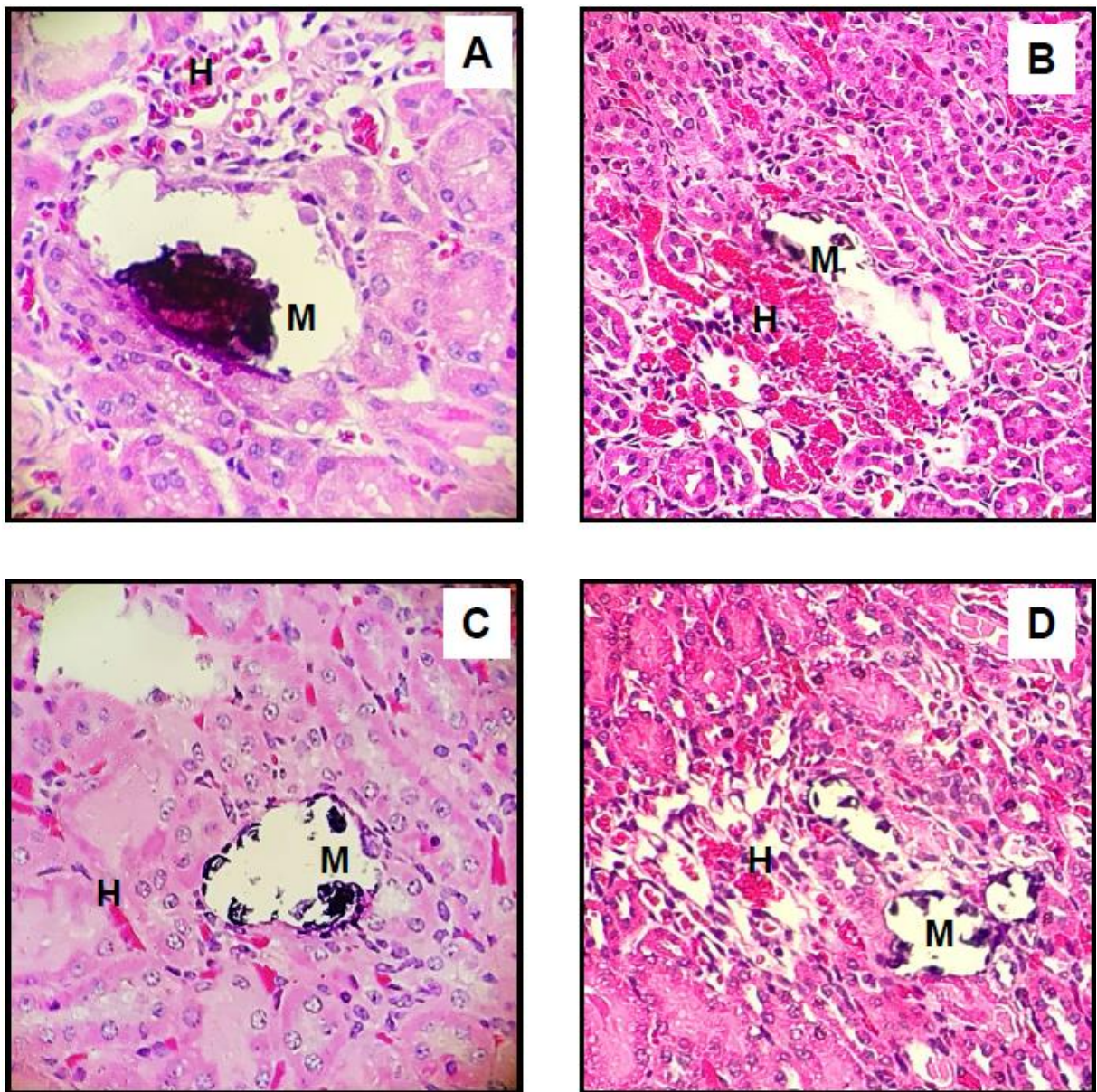
Figura 10 - Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-MPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-MPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-MPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 100x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: G= glomérulo; H = hiperemia; M = mineralização na luz tubular. ¹ Micropartículas de óxido de cobre.

Figura 11 - Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de rim de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs¹.



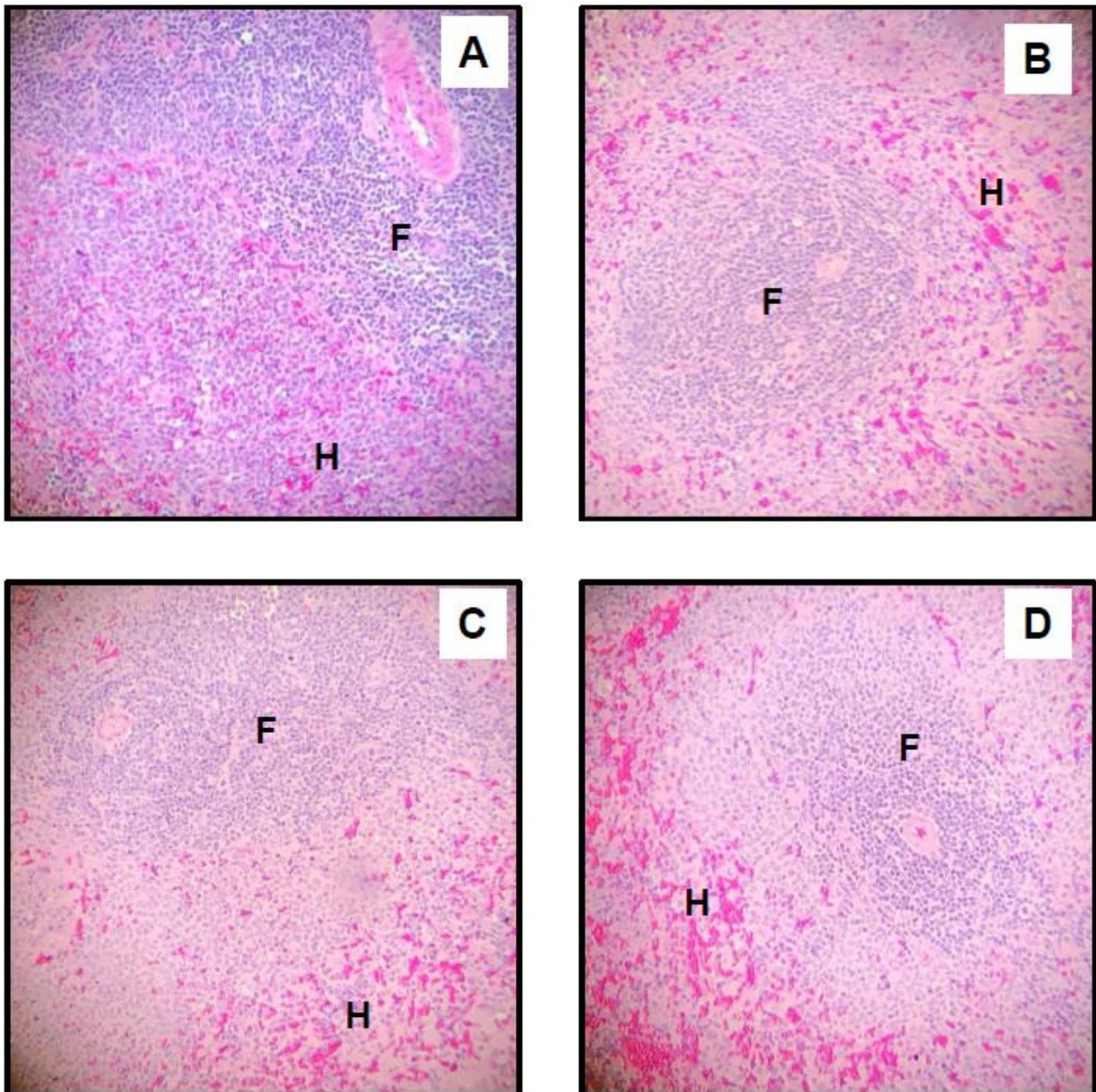
Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-MPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-MPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-MPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 200x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: H = hiperemia M = mineralização na luz tubular. ¹Micropartículas de óxido de cobre.

Na análise histopatológica do baço dos animais tratados tanto com CuO-NPs quanto com CuO-MPs, e nos dois grupos controle, foram encontrados hiperemia na polpa branca, folículos de Malpighi evidentes e megacariócitos. As Figuras 10 e 11 apresentam as fotomicrografias referentes aos baços dos animais tratados com CuO-NPs e as figuras 12 e 13 os baços dos animais tratados com CuO-MPs, sendo (A)

grupo controle, (B) 50 mg.kg⁻¹, (C) 300 mg.kg⁻¹ e (D) 2000 mg.kg⁻¹ em ambas as imagens. Não foram notadas diferenças significativas entre os controles e os grupos de animais tratados com CuO-NPs ou CuO-MPs.

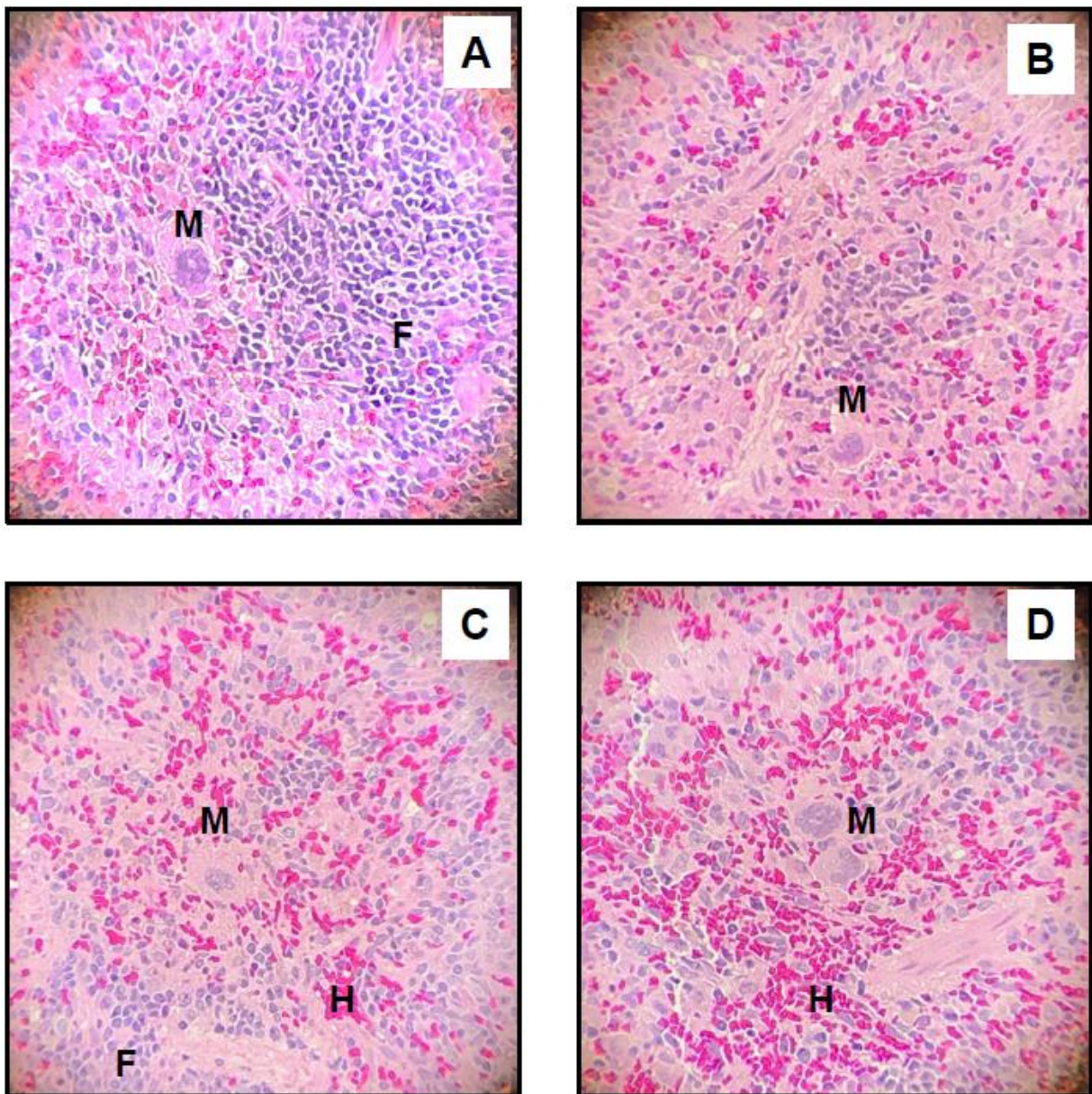
Figura 12 - Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-NPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-NPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 100x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: F = folículo de Malpighi; H = hiperemia. ¹Nanopartículas de óxido de cobre.

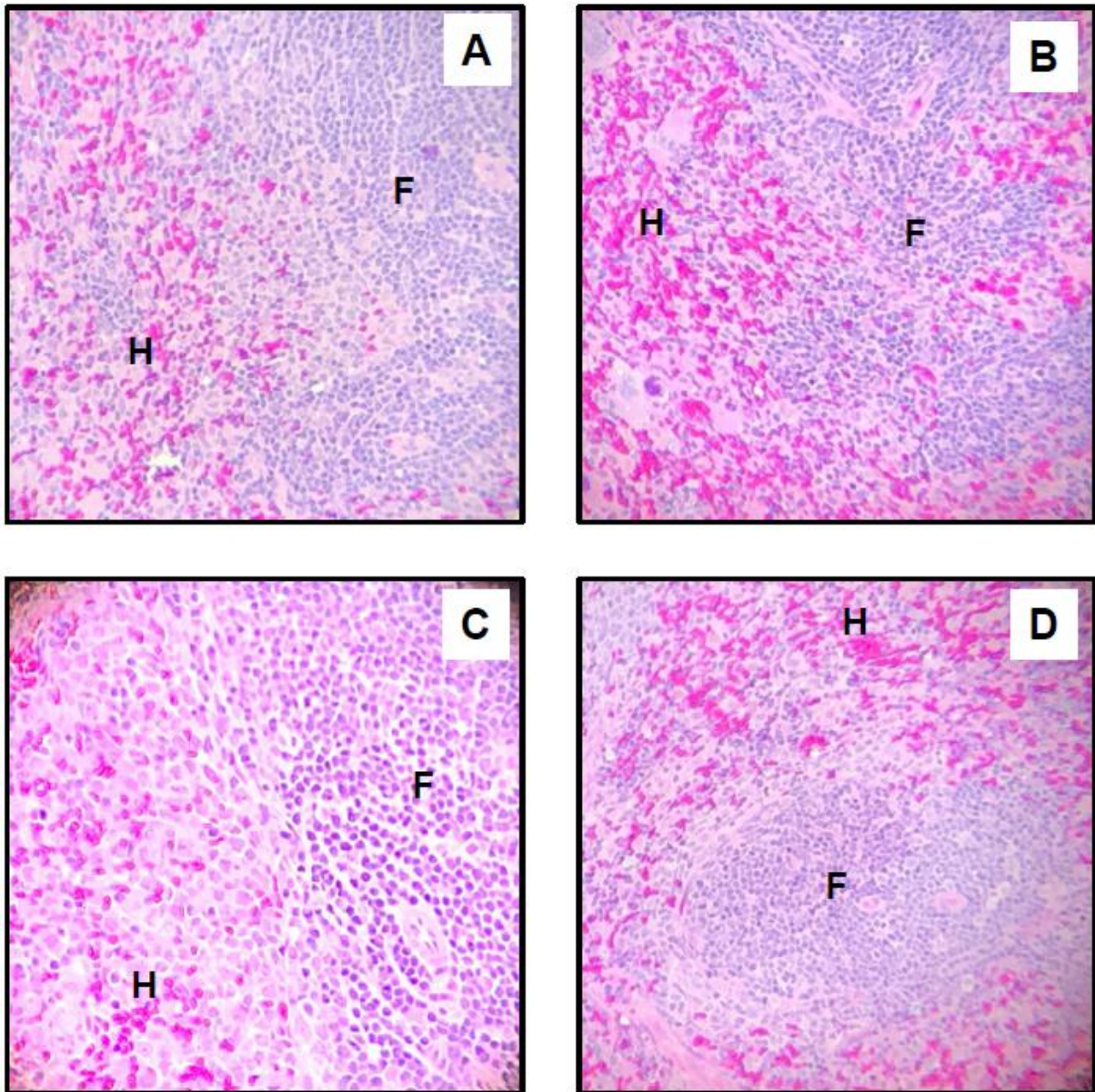
Figura 13 - Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-NPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-NPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-NPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 200x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: F = folículo de Malpighi; H = hiperemia; M = megacariócito. ¹Nanopartículas de óxido de cobre.

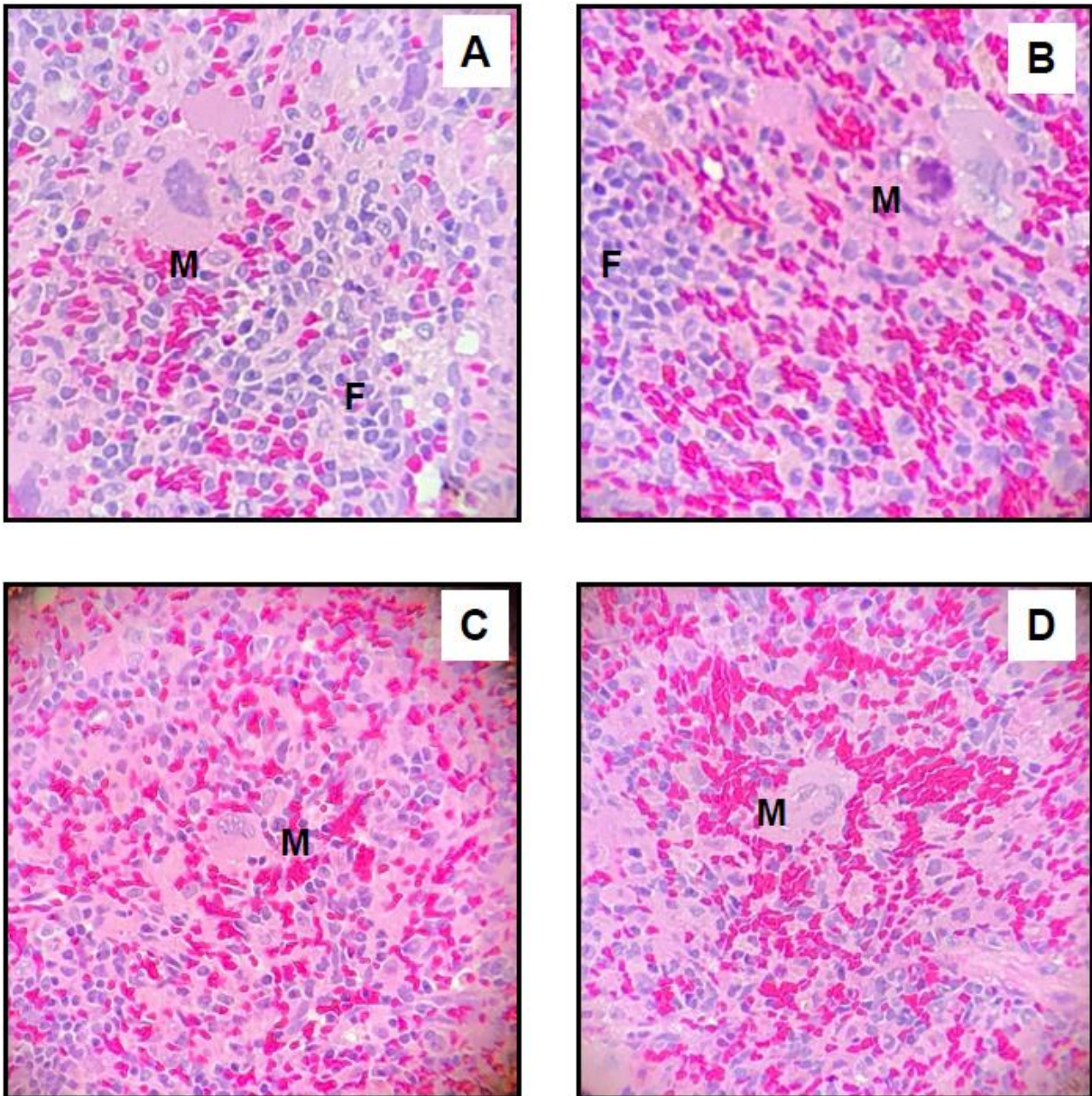
Figura 14 - Fotomicrografias (100x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração de CuO-MPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-MPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-MPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-MPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 100x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: F = folículo de Malpighi; H = hiperemia. ¹ Micropartículas de óxido de cobre.

Figura 15 - Fotomicrografias (200x) de cortes histológicos de baço de ratos Wistar de sexo feminino 14 dias após administração oral única de CuO-MPs¹.



Fonte: (Do autor, 2017).

A: Grupo controle (água ultrapura); B: CuO-MPs 50 mg.kg⁻¹; C: CuO-MPs 300 mg.kg⁻¹; D: CuO-MPs 2000 mg.kg⁻¹. Aumento de 200x. Lâminas coradas por hematoxilina-eosina. Indicações: F = folículo de Malpighi; M = megacariócito. ¹Micropartículas de óxido de cobre.

6 DISCUSSÃO

Uma vez que o principal material utilizado nesse estudo foram as nanopartículas – os ensaios com as micropartículas foram realizados para fins de comparação da toxicidade entre elas –, o primeiro passo a ser dado era a sua caracterização, para confirmar que seu tamanho se encontrava na escala nanométrica, e termos noção de seu formato.

Na análise do tamanho do diâmetro hidrodinâmico da partícula, que associa o diâmetro real da partícula a contra-íons e camadas de hidratação que difundem junto dela (NOMURA et al., 2013), obtivemos o valor médio de $166,9 \pm 2,54$ nm, que se encontraria fora da faixa preconizada pela ISO para NPs (ISO, 2010). Contudo, esta análise não mensura o real tamanho das NPs, e sim do seu diâmetro hidrodinâmico. Por este motivo, a análise por MET se faz necessária, para termos uma noção do formato e do tamanho seco das NPs.

Na MET, no caso das CuO-NPs, o tamanho médio encontrado foi de $25,17 \pm 8$ nm, estando dentro da faixa preconizada pela ISO. As NPs se apresentavam em pequenos aglomerados, com poucas partículas em cada um, sendo possível mensurá-las separadamente. 102 nanopartículas foram medidas e a maior parte se encontrava na faixa de 20 a 50 nm. No caso das CuO-MPs, observou-se a formação de grandes aglomerados de partícula, de tamanhos micrométricos. A menor partícula possível de ser mensurada, foi um aglomerado de cerca de 150 nm. Todos os aglomerados se encontravam na faixa de 150 nm a 5 μ m, tamanho máximo fornecido pelo fabricante na ficha de análise do produto (anexo 2).

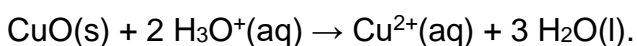
Sobre o potencial Zeta encontrado no trabalho, para a suspensão utilizando água ultrapura como meio dispersante, $16,7 \pm 0,86$ mV, ao levarmos em conta a referência consultada, podemos supor que a suspensão de NPs em água não apresentava uma estabilidade muito alta. Por este motivo, as suspensões utilizadas nos ensaios *in vivo* eram sempre preparadas pouco tempo antes das administrações, e agitadas logo antes de serem fornecidas ao animal.

No caso da análise do PDI, obtivemos o valor de 0,169 para a suspensão em água ultrapura. Por se tratar de um valor baixo, acreditamos que o sistema foi do tipo monodisperso. O Gráfico 01 da seção 4.1.3 também corrobora essa informação, demonstrando que só existe uma população de NPs no ensaio com água.

Na análise do tamanho das CuO-NPs em diferentes meios dispersantes, a intenção era de mimetizar os valores de pH do TGI humano, para termos uma idéia de como as nanopartículas estudadas se comportariam caso fossem deglutidas. Os meios de dispersão utilizados estão descritos na Farmacopeia Americana como soluções que mimetizam os diferentes valores de pH encontrados no TGI humano, e são utilizadas em ensaios de dissolução de medicamentos (REAGENTS, 2016).

Nesse ensaio, notamos que conforme o valor do pH aumentava – como ocorre em humanos, onde o pH vai aumentando ao longo do TGI (AIRES, 2012) –, as CuO-NPs também aumentavam de tamanho, provavelmente devido a aglomeração das mesmas. Com isso, podemos imaginar que, caso um humano ingerisse uma determinada quantidade de CuO-NPs, elas poderiam chegar ao final do intestino na forma de grandes aglutinados de tamanho micrométrico.

No pH que seria próximo ao gástrico – pH 1,2 – notamos que as NPs dissolviam com o passar do tempo, especialmente quando eram agitadas no banho de ultrassom. Acreditamos que esse fenômeno tenha ocorrido devido a uma reação de redução do CuO em meio ácido, levando à formação de íons cúpricos e água, como descrito na equação química:



Equação 03: Reação de redução do CuO em meio ácido

Esses achados são similares aos de Kim e colaboradores (2016), no estudo envolvendo Cu-NPs. Assim como no presente trabalho, os pesquisadores observaram que as NPs de cobre metálico dissolviam quase por completo em pH 1,5, e agregavam em pH acima de 6.

Essa liberação de íons Cu^{2+} pode ser relevante para a toxicidade das CuO-NPs que fossem ingeridas por humanos, uma vez que estudos demonstraram que o íon é mais tóxico que as NPs em diferentes matrizes (PIRET et al., 2012; THIT et al. 2016, 2017; ROTINI et al., 2017; ROTINI et al., 2018).

Outro ponto a ser considerado são os valores de potencial Zeta obtidos no ensaio que, como discutido anteriormente, indicam o quão estável é a suspensão. Porém, o pH é uma característica capaz de afetar o potencial Zeta. Por exemplo: se uma partícula em suspensão possui potencial Zeta negativo, uma vez que se adicione uma base a esta suspensão, as partículas presentes nela tenderão a adquirir cargas

mais negativas. Se ácidos são adicionados, eventualmente a neutralidade das cargas será atingida, com posterior alteração da carga para positiva. Ou seja, o potencial Zeta será positivo em pH ácido, e negativo em pH básico (MALVERN, 2004).

Essa alteração no potencial Zeta foi observada no ensaio, como representado na Tabela 01, do item 4.1.3. Conforme o pH foi alterado para básico, o potencial Zeta tornou-se mais negativo, e o inverso ocorreu para os pH com caráter ácido.

Sobre o PDI desta análise, todos os valores encontrados foram considerados baixos, demonstrando que, apesar de variar o tamanho das CuO-NPs de acordo com o aumento ou redução do pH do meio, os sistemas continuaram se apresentando monodispersos, como comprovado no Gráfico 01 da seção 4.1.3.

No entanto, os valores encontrados com os pH estudados não podem ser utilizados em conjunto com os dados obtidos nos experimentos *in vivo*, uma vez que o TGI dos ratos apresenta valores de pH diferentes dos humanos. No Quadro 4 abaixo, adaptado de McConnell, Basit e Murdan (2008), encontram-se os valores médios do pH em diferentes áreas do TGI de ratos, tanto em jejum quanto alimentados.

Quadro 4 - Valores médios de pH do trato gastrointestinal de ratos.

	Média de pH	
	Alimentado	Em jejum
Estômago	3,20	3,90
Duodeno	5,00	5,89
Jejuno	5,10	6,13
Íleo	5,94	5,93
Cecum	5,90	6,58
Cólon Proximal	5,51	6,23
Cólon Distal	5,77	5,88

Fonte: (Adaptado de MCCONNELL; BASIT; MURDAN, 2008).

Apesar dos valores de pH utilizados no estudo não serem iguais aos encontrados no TGI de ratos, podemos utilizar os dados obtidos para supor como as CuO-NPs se comportaram ao longo do TGI destes. Como os animais estavam em jejum de 12 horas antes do início do ensaio, pode-se assumir que o pH estomacal, no momento da administração das NPs, era em torno de 3,90. Com isso, realizando uma

aproximação com o pH 4,5 estudado no ensaio, é possível questionar se, ao entrar em contato com o estômago do animal, as CuO-NPs administradas formaram aglomerados com tamanho aproximado de 1 micrômetro, uma vez que o tamanho medido para esse pH foi de aproximadamente 1033 nm, como demonstrado na tabela 01 do item 5.1.3. Contudo, apesar de terem aglomerado, estas ainda são NPs, podendo apenas apresentarem liberação diferenciada em relação às não-aglomeradas.

O mesmo questionamento pode ser realizado para as outras partes do TGI dos animais, uma vez que em todos os valores de pH testados acima de 4,5, o tamanho de partícula se manteve acima de 1000 nm, saindo daquela que é preconizada como faixa de escala nanométrica (ISO, 2010).

O estudo de toxicidade oral aguda é o primeiro dos testes toxicológicos *in vivo* que precisam ser realizados no desenvolvimento de novos materiais que podem afetar de alguma forma a saúde da população. Seu principal objetivo é iniciar a caracterização do perfil toxicológico da substância, através da administração única (ou dividida ao longo de 24 horas) da mesma e observação dos animais ao longo de um determinado tempo para verificar a ocorrência de efeitos tóxicos que possam ser provenientes da substância ou um de seus metabólitos, identificação de órgãos alvos, possíveis efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas e bioquímicas, além de alterações anatômicas e histopatológicas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Uma vez que foram encontrados estudos na literatura demonstrando que a toxicidade das CuO-NPs é mais severa que das CuO-MPs, tanto *in vitro* (MANCUSO; CAO, 2014; KARLSSON et al., 2009) quanto *in vivo* (YOKOHIRA et al., 2008), optamos por realizar o ensaio de toxicidade aguda oral de maneira comparativa entre as NPs e as MPs. Para isso, utilizamos CuO comercial, com teor de 98% da marca Sigma-Aldrich, cuja ficha analítica encontra-se apresentada no Anexo 1.

A manutenção dos níveis de cobre como elemento traço essencial é função principalmente do fígado, que auxilia tanto na sua absorção quanto na excreta, dependendo do necessário naquele momento. A excreta principal de cobre se dá pela conjugação com a bile e posterior eliminação nas fezes, apesar de traços do elemento também serem excretados pela urina (IPCS, 1998).

Dentre os sinais clínicos avaliados, a única diferença observada foram as fezes do grupo de animais tratados com CuO-NPs na dose de 2000 mg.kg⁻¹. Estas se

encontravam com consistência amolecida e coloração negra brilhosa. De acordo com a literatura, o brilho nas fezes pode ser devido a esteatorréia – excreta elevada de lipídeos –, indicando um possível dano transitório – uma vez que no quinto dia de observação as fezes já se encontravam normais – no TGI dos animais desse grupo. Algumas das possíveis causas dessa condição são a obstrução dos canais biliares, insuficiência pancreática, fibrose cística, ou dano hepático (CHEIFETZ et al., 2011). Em relação a coloração negra das fezes, sugere-se que as CuO-NPs tenham sido excretadas por esta via nos primeiros dois dias, assim como ocorreu com as Cu-NPs no ensaio de Kim e colaboradores (2016).

Apesar dos poucos ensaios *in vivo* utilizando CuO-NPs não relatarem efeito tóxico similar ao encontrado no presente estudo, Chen e colaboradores (2006) notaram que os animais apresentaram diarreia e redução da apetência, após serem tratados com Cu-NPs, demonstrando que o metal cobre, bem como o íon Cu^{2+} podem causar danos ao TGI.

Embora não tenhamos dados sobre a quantidade de íons Cu^{2+} liberados a partir das CuO-NPs para a corrente sanguínea, Privalova e colaboradores (2014) demonstraram a ocorrência desse fenômeno, e também observaram que as CuO-NPs, quando administradas por via intraperitoneal, foram capazes de induzir dano hepático em exame de histopatologia.

Acreditamos então que as fezes alteradas encontradas nos animais tratados com a dose de 2000 mg.kg^{-1} de CuO-NPs podem ter sido geradas por esteatorréia causada por danos ao TGI – especialmente ao fígado –, possivelmente por íons Cu^{2+} liberados das CuO-NPs.

Uma vez que a mesma situação não foi observada no caso dos animais tratados com CuO-MPs, acreditamos que estas sejam menos hepatotóxicas que as CuO-NPs, o que estaria de acordo com Piret e colaboradores (2012), que, apesar de não terem utilizado MPs nos seus ensaios, demonstraram que NPs de 80 nm geram menos efeitos citotóxicos a hepatócitos que as de 50 nm, sugerindo assim que o tamanho de partícula é diretamente proporcional ao dano gerado pelo CuO.

O ganho de peso dos animais não apresentou resultados estatisticamente significativos, levando a concluir que tanto os animais tratados com as CuO-NPs quanto com as CuO-MPs se desenvolveram na velocidade normal, quando comparados com os respectivos grupos controle, e, de acordo com a literatura, todos

ganharam peso de acordo com o esperado para a espécie (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

Em relação a ingestão alimentar, no caso do grupo de animais que recebeu a administração de CuO-NPs na dose de 2000 mg.kg^{-1} , somente no primeiro dia esta foi estatisticamente diferente dos grupos controle e os tratados com outras doses. Contudo, nos dias subsequentes, a quantidade de ração consumida por esses animais foi normalizada, e não foram observados outros resultados estatisticamente significantes. Como o volume de NPs necessário para obtermos essa dose é consideravelmente elevado – quase 7 vezes maior que a segunda maior dose, de 300 mg.kg^{-1} –, acreditamos que o esvaziamento gástrico desse grupo tenha ocorrido de forma mais demorada, levando ao baixo consumo de alimento nesse dia. Essa diferença não foi observada no grupo dos animais tratados com CuO-MPs, provavelmente pela mesma justificativa de volume. Uma vez que as partículas micrométricas são maiores e mais densas, o volume necessário para atingirmos a dose foi menor, permitindo que o esvaziamento gástrico ocorresse mais rapidamente.

De acordo com a literatura consultada, esses animais consomem por dia cerca de 5 a 10 g de ração/100g de peso corporal (LAPCHIK; MATTARAIA; KO, 2009), estando todos os grupos estudados dentro dessa faixa de normalidade, inclusive o tratado com CuO-NPs 2000 mg.kg^{-1} , após o segundo dia de alimentação pós-administração.

Dentre os parâmetros hematológicos avaliados, não foram observadas alterações estatisticamente significativas entre os animais, nem quando comparados com os respectivos grupos controle. Contudo, ao recebermos os resultados dos exames, também nos foram enviados os valores de referência utilizados no ICTB e notamos que, para todos os grupos de animais, os valores de hemoglobina e plaquetas se encontravam fora da faixa.

Exemplificando, os valores de HGB encontrados para os grupos controle de CuO-NPs e CuO-MPs foram, respectivamente, $17,29 \pm 1,23 \text{ g/dL}$ e $16,01 \pm 0,30 \text{ g/dL}$, enquanto a referência do ICTB é $8,50 \pm 0,50 \text{ g/dL}$, ou seja, aproximadamente a metade dos valores encontrados. No caso das plaquetas, encontramos $1119,56 \pm 170,53 \text{ mil/mm}^3$ e $937,71 \pm 95,53 \text{ mil/mm}^3$, enquanto a referência seria $601,60 \pm 192,00 \text{ mil/mm}^3$.

Na literatura encontramos dados de parâmetros hematológicos, para ratos Wistar do sexo feminino da mesma cepa utilizada nesse estudo, provenientes de

outros biotérios ao redor do país, como os das Universidades Federais da Paraíba (CASTELLO BRANCO et al., 2011) e do Sergipe (MELO et al., 2012), da Universidade Luterana do Brasil (SILVA et al., [s.d.]) e da Universidade Tiradentes (LIMA et al., 2014), que apresentam valores para HGB e plaquetas similares aos encontrados nos nossos experimentos, como resumido no Quadro 5 abaixo. Esse fato nos leva a crer que, uma vez que é imprescindível que cada biotério estabeleça seus próprios valores de referência (DANTAS et al., 2006), talvez seja necessária uma reavaliação dos valores preconizados pelo ICTB, com a realização de novos ensaios com um *pool* atual de animais.

Quadro 5 - Valores de referência para hemoglobina e plaquetas de ratos Wistar de sexo feminino do ICTB e de quatro outros biotérios brasileiros.

	ICTB	UFPB	UFSE	ULB	Univ. Tiradentes
Hemoglobina (g/dL)	8,50 ± 0,50	15,0 ± 0,2	14,2 ± 0,53	14,6 ± 0,6	14,33 ± 1,19
Plaquetas (mil/mm ³)	601, 60 ± 192,00	616,0 ± 38,0	1004 ± 150,9	1007 ± 488,8	971,48 ± 140,43
ICTB = Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos; UFPB = Universidade Federal da Paraíba; UFSE = Universidade Federal de Sergipe; ULB = Universidade Luterana do Brasil					

Fonte: (Do autor, 2017).

Na avaliação bioquímica também foram encontradas discrepâncias em relação aos valores encontrados e os de referência enviados pelo ICTB, para os exames de cloro, glicose e CK de todos os grupos, sem apresentarem diferenças estatisticamente significantes entre eles. Em relação a glicose, o mesmo já havia sido observado no trabalho de Bravin (2016), que utilizou ratos Wistar provenientes da mesma colônia, e também realizou os exames sanguíneos no ICTB. Exames de cloro e CK não foram realizados neste estudo. Estes resultados bioquímicos também nos levam a acreditar que talvez seja necessário um novo ensaio de determinação dos valores de referência para exames de ratos Wistar realizados no ICTB.

O fósforo medido para o grupo da dose de 2000 mg.kg⁻¹ de CuO-MPs se encontrava elevado – 9,84 ± 0,49 frente a 7,82 ± 0,27 do controle –, com resultado estatisticamente significativo (p = 0,002), porém, ainda se encontrava dentro da faixa de referência utilizada pelo ICTB.

No caso dos animais do grupo CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,041$), em relação ao grupo controle, somente para a enzima AST. As enzimas transaminases, quando apresentam doseamento alterado, podem ser marcadoras de lesão hepática (THRALL, 2007). Infelizmente os kits necessários para avaliação dos níveis de gama glutamil transferase, que auxiliaria a avaliar dano hepático, e de albumina, que contribui para verificar a produção de proteínas hepáticas (THRALL, 2007), não estavam disponíveis no ICTB no momento dos ensaios. Ademais, o valor encontrado para a enzima ALT e os níveis de fosfatase alcalina – outro marcador de lesão hepática (THRALL, 2007) – para o grupo administrado com a dose de 2000 mg.kg⁻¹ de CuO-NPs encontravam-se normais, quando comparados com o grupo controle. No caso de Privalova e colaboradores (2014), também foi observada alteração no nível das enzimas transaminases, sugerindo o dano hepático, que foi posteriormente confirmado no exame de histopatologia.

No exame histopatológico dos fígados, foi encontrada degeneração vacuolar intracitoplasmática, que geralmente ocorre quando a célula se encontra em condição de hipóxia, hipertermia ou em infecções bacterianas e virais (McGAVIN; ZACHARY, 2009). Uma vez que todos os fígados estudados, inclusive dos grupos controle, apresentaram este achado, este foi associado à eutanásia, pois a punção cardíaca total pode ter conduzido à condição de hipóxia celular.

Outros dois achados relevantes nas lâminas analisadas foram a binucleação dos hepatócitos – células contendo dois núcleos – e a megalocitose, que são condições consideradas normais, uma vez que o fígado possui elevada capacidade regenerativa. Porém, também podem ser associadas a lesão hepática, causada ou não por intoxicação, devido ao aumento na renovação celular gerado pelo estresse no órgão (McGAVIN; ZACHARY, 2009). Apesar da megalocitose ter ocorrido em todos os grupos testados com CuO-NPs e CuO-MPs, e não nos controles, a binucleação foi observada em todos os órgãos analisados. Uma vez que não foram encontrados focos de inflamação, necrose nem *debris* celulares, concluímos que, se tiver ocorrido lesão hepática, esta foi branda e os fígados recuperaram-se ao longo dos 14 dias do teste.

Nas observações macroscópicas realizadas durante a necropsia, não foram notadas alterações na morfologia dos órgãos de nenhum animal utilizado nos ensaios, assim como na literatura referente a ensaios *in vivo* com as CuO-NPs (PRIVALOVA et al, 2014; GOSENS et al., 2016). Todos os órgãos se encontravam nas condições

normais de aspecto, coloração e posição anatômica, ao compararmos os grupos tratados com CuO-NPs ou CuO-MPs com os controles. Este resultado difere do encontrado por Chen e colaboradores em 2006, sugerindo que as Cu-NPs têm um potencial tóxico mais elevado que as CuO-NPs, possivelmente pelo fato do metal “puro” se encontrar mais disponível para realizar a reação “tipo Fenton”, que leva à formação de ROS, conforme sugerido por Linder (2001), do que sua forma já oxidada.

Assim como no trabalho de Gosens e colaboradores (2016), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no peso dos órgãos isolados dos animais tratados com CuO-NPs. Os outros estudos *in vivo* utilizando CuO-NPs não traziam dados sobre o peso dos órgãos.

Nos exames histopatológicos, foram observadas hiperemias – acúmulo de sangue em quantidade elevada em vasos sanguíneos (McGAVIN; ZACHARY, 2009) – em todos os órgãos analisados – fígado, rins e baço – de todos os animais. Também foi notada dilatação dos vasos capilares sinusóides hepáticos. Esses achados foram atribuídos à eutanásia realizada com barbitúrico (tiopental), que gera relaxamento da musculatura lisa com conseqüente vasodilatação (TOWNSEND et al., 2014).

A mineralização observada na luz dos túbulos renais ocorre devido ao acúmulo de sais – especialmente de cálcio – nessa porção dos rins. De acordo com o *National Research Council* (1995), o teor aconselhável para cálcio na ração dos animais é de 5 g de Ca por kilo de alimento. Uma vez que, de acordo com a tabela nutricional da ração utilizada no SAL/DFT/INCQS, apresentada no Quadro 3 do item 3.2.2., o teor de cálcio é de 14 g.kg⁻¹, acreditamos que o consumo deste tenha ocorrido de forma elevada, e esta seja a causa da mineralização observada em todos os grupos.

A polpa branca do baço é normalmente formada por folículos linfóides, chamados de Folículos de Malpighi, que se encontravam normais em todos os órgãos analisados, de acordo com a literatura (BACHA; BACHA, 2003). Os megacariócitos, que também foram encontrados em todas as lâminas de baço analisadas, são células responsáveis pela produção de plaquetas. Uma vez que, em roedores, o baço é o órgão responsável pela produção deste tipo celular durante a fase adulta (ABRAHAMSOHN, [s.d.]), este achado foi considerado normal.

Ao considerarmos os achados bioquímicos, histopatológicos e a esteatorréia observada nos dois primeiros dias do teste, podemos sugerir um possível dano hepático com ativação da regeneração nos fígados dos animais que entraram em contato com CuO de ambos os tamanhos, especialmente as NPs. Porém, os dados

gerados somente neste trabalho não são suficientes para afirmarmos uma intoxicação causada pelas CuO-NPs, apesar da literatura consultada demonstrar que estas podem ser danosas ao fígado.

7 CONCLUSÃO

Os ensaios simulando os diferentes valores de pH do TGI humano demonstraram que as CuO-NPs solubilizam rapidamente em meio ácido (estômago) e aglomeram em meio básico (intestino).

Na avaliação dos sinais clínicos em ratos Wistar de sexo feminino, a única observação foi em relação às fezes dos animais administrados com CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹, que se encontravam brilhosas, negras e amolecidas. Os grupos restantes não apresentaram nenhum dos sinais de toxicidade estudados.

Não ocorreram óbitos no período do teste, sugerindo não haver características letais para as CuO-NPs em casos de uma única administração pela via oral, nas doses estudadas.

Todos os animais ganharam peso e tiveram a ingestão alimentar de acordo com os dados fisiológicos esperados.

Na avaliação hematológica, a maioria dos parâmetros analisados variou dentro dos padrões de normalidade, sem alterações estatísticas significativas.

A maior parte dos parâmetros bioquímicos analisados variou dentro dos padrões de normalidade, sem alterações estatísticas significativas.

No caso dos animais tratados com CuO-NPs 2000 mg.kg⁻¹, verificou-se uma alteração no exame da enzima AST. Os achados histopatológicos sugerem que o fígado de todos os animais, tratados tanto com CuO-NPs quanto com CuO-MPs, em todas as doses, encontrava-se em processo de recuperação pós-lesão leve. Porém, por não possuímos dados referentes a outras proteínas hepáticas, pela enzima ALT de todos os grupos não ter apresentado valores discrepantes dos controles, e por não terem sido evidenciados sinais de inflamação, necrose ou doença hepática nos exames histopatológicos, não podemos concluir se ocorreu ou não o dano hepático.

Os exames anatomopatológicos não evidenciaram alterações nos órgãos analisados.

Os achados histopatológicos para os rins e o baço de todos os animais foram considerados normais.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que, até o momento, as nanopartículas de óxido de cobre, com tamanho médio de diâmetro hidrodinâmico de 166,9 ± 2,54 nm, não apresentaram sinais conclusivos de toxicidade, quando

administradas por via oral e de forma aguda, ou seja, uma única administração, nas doses de 50, 300 e 2000 mg.kg⁻¹.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P. **MOL – Microscopia OnLine**: seu guia interativo de histologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, [s.d]. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/mol/>>. Acesso em: 07 jan. 2018.

AIRES, Margarida de Mello. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AKHTAR, M. et al. Dose-dependent genotoxicity of copper oxide nanoparticles stimulated by reactive oxygen species in human lung epithelial cells. **Toxicol Ind Health**, v. 32, n. 5, p. 809-821, 2016.

AN, L. et al. Cognitive impairment in rats induced by nano-CuO and its possible mechanisms. **Toxicol Lett**, v. 213, n. 2, p. 220-227, 2012.

ANDRADE A.; PINTO S.C.; OLIVEIRA R.S. **Animais de laboratório**: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerencia de Avaliação de Segurança e Eficiência Brasília, 31 de Janeiro de 2013 versão 2. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 11 out. 2017.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Sci. Total Environ.**, v. 407, n. 4, p. 1461-8, 2009.

ASSADIAN, E. et al. Toxicity of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles on Human Blood Lymphocytes. **Biol Trace Elem Res**, 2017.

BACHA, William J.; BACHA, Linda M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003.

BAEK, Y.-W.; AN, Y.-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. **Sci Total Environ**, v. 409, n. 8, p. 1603-1608, 2011.

BORZELLECA, J. F. Paracelsus: herald of modern toxicology. **Toxicol. Sci.**, v. 53, n. 1, p. 2-4, jan. 2000.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Palácio do Planalto**, Brasília, 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm>. Acesso em: 04 fev. 2018

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Palácio do Planalto**, Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm>. Acesso em: 15 mar. 2017.

BRAVIN, J. S. **Avaliação da toxicidade oral aguda de um análogo de mexiletina candidato a fármaco antiasmático**. 2016. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

BULCKE, F.; THIEL, K.; DRINGEN, R. Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in cultured primary brain astrocytes. **Nanotoxicology**, p. 1-11, 2013.

BULCKE, F.; DRINGEN, R. Copper Oxide Nanoparticles Stimulate Glycolytic Flux and Increase the Cellular Contents of Glutathione and Metallothioneins in Cultured Astrocytes. **Neurochem Res**, v. 40, n. 1, p. 15-26, 2014.

CARRANZA OROPEZA, M. V. **Síntese e caracterização de nanopartículas núcleo-casca de poliestireno e polimetacrilato de metila obtidas por polimerização em emulsão sem emulsificante e foto iniciada**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Química, São Paulo, 2011.

CASTELLO BRANCO, A. C. S. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CHEIFETZ, A. S. et al. **Oxford American Handbook of Gastroenterology and Hepatology**. Oxford: Oxford University Press, 2011.

CHEN et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicol Lett**, v. 163, n. 2, p. 109–120, 2006.

COCCINI, T. et al. Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. **NeuroToxicology**, v. 48, p. 77-89, 2015.

COLVIN, V. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1166-70, 2003.

COUSINS, R.J. Metal elements and gene expression. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 14, p. 449–469, 1994.

CRONHOLM, P. et al. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. **Small**, v. 9, n. 7, p. 970-982, 2013.

CZAJKA, M. et al. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 5, p. 1042-52, 2015.

DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. **Occup. Environ. Med.**, v. 61, n. 9, p. 727-728, set. 2004.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 2, p. 129-137, 2012.

FLEISCHER, T.; JAHNEL, J.; SEITZ, S. B. **NanoSafety - Risk Governance of Manufactured Nanoparticles**: final report. Brussels: STOA, 2012.

FRÖHLICH, E.; SALAR-BEHZADI, S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 3, p. 4795-822, 2014.

GOSENS, I. et al. Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 8, p. 1-12, 2016.

HU, R. et al. Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Mater.**, v.191, n. 1-3, p. 32-40, 2011.

HUANG, K.-T. et al. Titanium Nanoparticle Inhalation Induces Renal Fibrosis in Mice via an Oxidative Stress Upregulated Transforming Growth Factor- β Pathway. **Chem Res Toxicol**, v. 28, n. 3, p. 354-364, 2015.

IaIPCS (International Program On Chemical Safety). **Environmental Health Criteria 200: Copper**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1998. p. 360.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO Technical Specification on Nanotechnologies – Vocabulary – (Pt 1): Core terms (ISO/TS 80004-1:2010)**. Switzerland, 2010.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. National Academy Press, 2001.

KALAIARASI, A. et al. Copper oxide nanoparticles induce anticancer activity in A549 lung cancer cells by inhibition of histone deacetylase. **Biotechnol Lett**, p. 1-8, 2017.

KARLSSON, H. et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 9, p. 1726-1732, 2008.

KARLSSON, H. et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. **Toxicol Lett**, v. 188, n. 2, p. 112-118, 2009.

KIM, J.-C. et al. Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats. **Int J Nanomedicine**, Volume 11, p. 2883–2900, 2016.

KO, J.-W. et al. Copper oxide nanoparticle induces inflammatory response and mucus production via MAPK signaling in human bronchial epithelial cells. **Environ Toxicol Phar**, v. 43, p. 21-26, 2015.

KRUPANIDHI, S.; SREEKUMAR, A.; SANJEEVI, C.B. Copper & biological health. **Indian Journal of Medicine. Res.**, v. 128, p. 448–461, 2008.

LAI, J. C. et al. Treatment of human astrocytoma U87 cells with silicon dioxide nanoparticles lowers their survival and alters their expression of mitochondrial and cell signaling proteins. **Int. J. Nanomedicine**, v. 5, p. 715-23, 5 out. 2010.

LAPCHIK, V.V; MATTARAIA, V.M.; KO, G.M. **Cuidado e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2009.

LIMA, C.M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v.10, n.03, p.1-9, 2014.

LINDER M.C. Copper and genomic stability in mammals. **Mutat Res/Fundam Mol Mech Mutagen**, v. 475, p. 141–152, 2001.

LINDER, M.C., HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 63, p. 797S-811S, 1996.

LIU, Z. et al. Nano-CuO inhibited voltage-gated sodium current of hippocampal CA1 neurons via reactive oxygen species but independent from G-proteins pathway. **J Appl Toxicol**, v. 31, n. 5, p. 439-445, 2011.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer nano series**: user manual MAN0317. EUA, 2004. v.11.

MCCONNELL, E.; BASIT, A.; MURDAN, S. **Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in vivo experiments**. *J Pharm Pharmacol.*, v. 60, n. 1, p. 63-70, 2008.

MCGAVIN M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**, 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 2009

MANCUSO L.; CAO G. Acute toxicity test of CuO nanoparticles using human mesenchymal stem cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 7, p. 449-454, 2014.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, 2012.

MOHAMMADIPOUR, A.; FAZEL, A.; HAGHIR, H. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 617-625, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**. 4. ed. Washington, DC: The National Academies Press, 1995

NEMEN; LEMOS-SENNA. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NOMURA, D.A. et al. Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems. In: **Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica**, XLII, 2013, Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

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

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials**. Paris: 2009

_____. **Developments in delegations on the safety of manufactured nanomaterials**: tour de table. Paris, 2017

_____. **Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**: guide 420. Paris, 2001a.

_____. **Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**: guide 423. Paris, 2001b.

_____. **Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)**: guide 425. Paris, 2008.

OLIVARES, M.; UAUY, R. Copper as an essential nutrient. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 63, p. 791S–796S, 1996.

PARK, J.-W. et al. Copper oxide nanoparticles aggravate airway inflammation and mucus production in asthmatic mice via MAPK signaling. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 4, p. 445-452, 2016.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PIRET, J.-P. et al. Copper(ii) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response. **Nanoscale**, v. 4, n. 22, p. 7168-7184, 2012.

PRIVALOVA, L. et al. Subchronic Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles and Its Attenuation with the Help of a Combination of Bioprotectors. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 7, p. 12379-12406, 2014.

REAGENTS: Buffer Solutions. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National formulary 34. Rockville: The United States Pharmacopeical Convention, 2016. v. 1.

ROTINI, A. et al. Salinity-Based Toxicity of CuO Nanoparticles, CuO-Bulk and Cu Ion to *Vibrio anguillarum*. **Frontiers Microbiol**, v. 8, p. 2076, 2017.

ROTINI, A. et al. Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species. **Ecotox Environ Safe**, v. 147, p. 852-860, 2018.

SCHEINBERG, H.; STERNLIEB, I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 63, p. 842S–845S, 1996.

SILVA, L. et al. **Perfil hematológico de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) do biotério da Universidade Luterana do Brasil**. [s.d]. Disponível em: <www.conferencias.ulbra.br/index.php/fpu/xv/paper/view/3571/1698>. Acesso em: 10 dez. 2017.

THIT, A. et al. Acute toxicity of copper oxide nanoparticles to *Daphnia magna* under different test conditions. **Toxicol Environ Chem**, p. 1-15, 2016.

THIT, A. et al. Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos and fry. **Toxicol In Vitro**, v. 45, p. 89-100, 2017.

THIT, A.; SELCK, H.; BJERREGAARD, H. Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): effects on proliferation, cell cycle progression and cell death. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1596-1601, 2013.

THIT, A.; SELCK, H.; BJERREGAARD, H. Toxic mechanisms of copper oxide nanoparticles in epithelial kidney cells. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 5, p. 1053-1059, 2015.

THRALL, Mary Anna. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TOWNSEND, C.D. et al. **Sabiston**: tratado de cirurgia: A base biológica da prática cirúrgica moderna. 19. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. v. 2.

TUNÇSOY, M. et al. Effects of copper oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and on tissue accumulation of oreochromis niloticus. **B Environ Contam Tox**, v. 99, n. 3, p. 360-364, 2017.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drugs Evaluation Research. **Manual of policies and procedures reporting format for nanotechnology related information in CMC review**. Maryland: Office of Pharmaceutical Science, 2010.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Guidance for industry assessing the effects of significant manufacturing process changes, including emerging technologies, on the safety and regulatory status of food ingredients and food contact substances, including food ingredients that are color additives**. Maryland: Office of Food Additive Safety, 2012.

U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Draft toxicological profile for zinc**. Atlanta, Georgia, 2003. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

WANG, B. et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. **Toxicol Lett**, v. 161, n. 2, p. 115-123, 2005.

WANG, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 2, p. 176-185, 2007.

WANG, Z. et al. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. **Chem Res Toxicol**, v. 25, n. 7, p. 1512-1521, 2012.

WATSON, C. et al. High-Throughput Screening Platform for Engineered Nanoparticle-Mediated Genotoxicity Using CometChip Technology. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2118-2133, 2014.

WU, F. et al. **Uptake and toxicity of CuO nanoparticles to *Daphnia magna* varies between indirect dietary and direct waterborne exposures.** *Aquat Toxicol*, v. 190, p. 78-86, 2017.

XU, J. et al. Nanosized copper oxide induces apoptosis through oxidative stress in podocytes. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 6, p. 1067-1073, 2013.

XU, L. et al. In vitro study on influence of nano particles of CuO on CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus potassium currents. **Environ Toxicol**, v. 24, n. 3, p. 211-217, 2009.

YOKOHIRA, M. et al. Lung Toxicity of 16 Fine Particles on Intratracheal Instillation in a Bioassay Model Using F344 Male Rats. **Toxicol Pathol**, v. 36, n. 4, p. 620-631, 2008.

YOKOHIRA, M. et al. Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO₂ Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats. **J Toxicol Pathol**, v. 22, n. 1, p. 71-78, 2009.

ZATTA, P. Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. **Brain Res. Rev.**, v. 54, p. 19-33, 2007.

ZHANG, X.D. et al. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. **International Journal Nanomedicine**, v. 6, p. 2071-2081, 2011.

ANEXO 1 - FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO (FISPQ) DO ÓXIDO DE COBRE (II)

Rev. Março/2003

ÓXIDO DE COBRE II



1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO

Nome químico: óxido de cobre II

Fórmula química: CuO

Sinônimos: óxido de cobre preto; óxido cúprico.

CAS: 1317-38-0

2. COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE INGREDIENTES

Número CAS: 1317-38-0 100 % PERIGOSO

3. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS

VENENOSO! PERIGOSO SE INGERIDO. AFETA O FÍGADO E RINS. CAUSA IRRITAÇÃO NA PELE, OLHOS E TRATO RESPIRATÓRIO.

EFEITOS POTENCIAIS PARA A SAÚDE:

- Por inalação: causa irritação no trato respiratório. Os sintomas podem incluir soluço, dor de garganta e dificuldade respiratória. Pode resultar em ulceração e perfuração do trato respiratório. Quando aquecido, seus fumos produzem calafrios.
- Por ingestão: os sintomas por envenenamento por cobre incluem danos capilares, dor de cabeça, calafrios, pulso fraco, danos no rim, fígado, sistema nervoso central, seguido de depressão, convulsões, efeitos no sangue, paralisia e coma. A morte pode ocorrer devido ao choque e falência renal.
- Contato com os olhos: causa irritação com vermelhidão e dor. Causa danos aos olhos.
- Contato com a pele: causa irritação com vermelhidão e dor.
- Exposição crônica: Exposições repetidas e prolongadas podem causar dermatite na pele. Exposições repetidas e prolongadas de pó de sais de cobre podem causar descoloração da pele e do cabelo, danos ao fígado e sangue, ulceração e perfuração do septo nasal, gosto metálico e irritação nas membranas das mucosas.
- Agravamento de condições pré-existentes: problemas de rim, pulmões, fígado, pele, deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, doença de Wilson podem ser agravados com o manuseio deste material.

4. MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

CONTATO COM A PELE: Lave com água e sabão em abundância por 15 minutos. Remova as roupas e sapatos contaminados. Procure cuidados médicos. Lave as roupas para usar novamente.

INALAÇÃO: Remova a vítima para o ar fresco. Caso não haja respiração, faça respiração artificial. Se houver dificuldade respiratória, dê oxigênio. Procure orientação médica.

CONTATO COM OS OLHOS: Imediatamente lave os olhos com fluxo intenso de água por aproximadamente 15 minutos, movimentando as pálpebras para cima e para baixo ocasionalmente. Procure cuidados médicos imediatamente.

INGESTÃO: Induza o vômito imediatamente e vá diretamente ao médico para maiores cuidados. Nunca coloque nada na boca de um pessoa inconsciente. Procure atendimentos médicos.

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Não considerado perigoso de incendiar. Grandes quantidades expostas ao ar em temperatura acima de 100°C podem resultar em combustão espontânea. Chamas quando envolvem este material podem ser controladas com névoa de água, CO₂ e espuma.

6. MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO E VAZAMENTO

Ventile a área e usar máscara protetora P1/P2, óculos de segurança e luva descartável para limpar o ambiente. Encaminhe os resíduos para aterro classe 1.

7. MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

Ao manusear este produto use máscara P1/P2, avental de manga longa, óculos de segurança e luvas descartáveis. Evite o contato e inalação do pó. **PRECAUÇÕES NO ARMAZENAMENTO:** Armazene em lugar seco e arejado. Estoque na **ÁREA VERDE** do almoxarifado.

8. CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Para chumbo metálico e poeiras inorgânicas:

Limites de Exposição Permitidos:

OSHA: PEL: $1\text{mg}/\text{m}^3$

Limites de Exposição Permitidos:

ACGIH: TLV: $1\text{mg}/\text{m}^3$ (TWA)

VESTIMENTA MÍNIMA RECOMENDADA: avental de manga longa e óculos de segurança

LUVAS: de borracha descartáveis

MÁSCARA RESPIRATÓRIA RECOMENDADA: P1/P2

9. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Descrição física: pó preto amarronzado ou grânulos

Odor: inodoro

Massa molecular: 79,55

Densidade: 6,32 @ 14°C/4

Ponto de fusão: 1026 °C

% voláteis por volume @ 21°C: 0

SOLUBILIDADE: insolúvel em água

10. ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Este composto é termicamente estável em condições normais de estocagem. Evite contato com incompatíveis. É incompatível com alumínio, boro, carbeto de cério acetileno, acetileno dirubídio, hidrazina, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio, óxido de chumbo, magnésio, metais, fosfan, potássio, anidrido flúico, carbeto de acetileno rubídio, sódio, titânio e zircônio. Forma acetiletos com acetileno, hipobromito de sódio e nitrometano.

11. INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

CARCINOGENICIDADE: nada conhecido.

12. INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Quando lançado no solo, na água este material não biodegrada.

13. CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Encaminhe os resíduos para aterro classe 1.

14. INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

Não regulamentado.

15. REGULAMENTAÇÕES

NFPA: Saúde: 2 Inflamabilidade: 1 Reatividade: 0

Rótulo: **VENENO! PERIGOSO SE INGERIDO. AFETA O FÍGADO E RINS. CAUSA IRRITAÇÃO NA PELE, OLHOS E TRATO RESPIRATÓRIO.**

BIBLIOGRAFIA

Guia de Seleção de Respiradores 3M. 2001.

<http://www.jlbaker.com>

ELABORADO E REVISADO PELA COORDENAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES –
PROFESSORA MARIA LUCILA UJVARI DE TEVES

ANEXO 2 - FICHA DE ANÁLISE DE CuO DA MARCA SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Copper(II) oxide, powder, <10 µm, 98%
Product Number	208841
Product Brand	SIGALD
CAS Number	1317-38-0
Molecular Formula	CuO
Molecular Weight	79.55

TEST

Appearance (Color)	Black
Appearance (Form)	Powder
Complexometric EDTA (% Cu)	79.3 %
ICP: Confirms Copper Component	Conforms
Specification Date:	JAN 2009
Date of QC Release:	FEB 2009
Print Date:	FEB 02 2009

LOT MKAA1788 RESULTS

Barbara Rajzer, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

ANEXO 3 - CERTIFICADO REFERENTE A LICENÇA CEUA LW-37/17



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-37/17

Certificamos que o protocolo (P-11/17-4), intitulado "Avaliação da toxicidade aguda após exposição a nanopartículas de óxido de cobre.", sob a responsabilidade de FABIO COELHO AMENDOEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/12/2018 e inclui o uso total de :

Rattus norvegicus

- 40 Fêmeas de Wistar, Idade: 10 Semana(s).

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550