

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

Priscila Gianini Gonzalez

**APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS**

Rio de Janeiro

2021

Priscila Gianini Gonzalez

APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS

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

Orientador: Isabella Fernandes Delgado

Coorientador: Cristiane Caldeira da Silva

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Gianini Gonzalez, Priscila

Aplicabilidade dos métodos alternativos na avaliação toxicológica de nanopartículas. / Priscila Gianini Gonzalez. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

129 f. : il. ; fig. ; graf. ; 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, 2020.

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado.

Co-orientadora: Cristiane Caldeira da Silva.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Métodos alternativos. 2. Nanopartículas. 3. Controle de qualidade. 4. Vigilância sanitária. I. Título.

Alternative methods' applicability in nanoparticles' toxicological evaluation.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Priscila Gianini Gonzalez

APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS NA AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS

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

Aprovado em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Kátia Christina Leandro (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Luciene de Oliveira Morais (Doutora)
Universidade Salgado de Oliveira

Marcelle Gomes de Souza Pegurier (Doutora)
Comitê Olímpico do Brasil

ORIENTADORES

Isabella Fernandes Delgado (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Cristiane Caldeira da Silva (Doutora) – Coorientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a todos os animais que padecem nas mãos do homem, seja por abandono, maltrato, indiferença ou especismo.

AGRADECIMENTOS

Ao criador, pela oportunidade de fazer a diferença, pela coragem de ir à contramão. Pela força que não sei de onde vem, que aparece quando tudo fica preto, quando o chão some, quando as certezas desaparecem, quando tudo fica sem solução. Pela força que me fez seguir, quando a maioria desistiria; que me fez levantar e acreditar, depois de viver o pior momento em 41 anos de vida. Obrigada, senhor, por ter me confiado à família cuidadosa que me ampara ao longo da jornada. Pelos privilégios que tenho e que passam, muitas vezes, despercebidos, mesmo num mundo tão desigual.

À minha querida mãe, que se tornou a principal viabilizadora deste estudo depois da bela surpresa que a vida me providenciou, hoje já com 2 aninhos. GRATIDÃO aos meus pais, por todos os momentos vividos e lições aprendidas com nossos erros e acertos. Obrigada, mãe, obrigada, pai, por toda a dedicação. Às poderosas orações da vó Minda e da vó Nea, que fazem o melhor acontecer, no caos. À prima preferida, pelo apoio técnico e pelas produções Globo na defesa.

À minha pequena Babi, por cada gargalhada, beijo e amasso, regados a muita energia infantil, que foram meu combustível para momentos tão difíceis. Obrigada, querida filha, pela sensação indescritível que é ser a coisa mais importante da vida de alguém. Queria tanto que você tivesse chegado num momento menos conturbado para poder te dar a atenção que você merece... Agora vai ficar mais fácil!

À minha irmã adotiva, Magali, pelas horas a fio de conversas terapêuticas no momento do naufrágio... Sem palavras. Se tem alguma coisa que pode amenizar a pior dor do mundo, é ser ouvido, ser compreendido, ser apoiado. Obrigada, minha amiga, por estar sempre ali, ao alcance de um zap. Obrigada, minha amiga, por tantas boas trocas, incluindo as maternas, nesses tantos anos de amizade. Obrigada, minha amiga. Amigos, são membros da família que Deus me permite escolher.

Ao mestre André Silva, meu consultor para assuntos aleatórios, que foi também enviado por Deus para caminhar comigo nessa jornada, para que eu pudesse cruzar a linha de chegada. GRATIDÃO!

Às minhas orientadoras Isabella e Cristiane, pelos conhecimentos compartilhados e pela compreensão em momentos difíceis. À Luciene, pelas importantes contribuições.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Pergunte aos cientistas por que a experimentação com animais, e a resposta será: ‘Porque os animais são como nós.’ Pergunte a eles porque é moralmente certo a experiência em animais, e a resposta será: ‘Porque os animais não são como nós.’ A experimentação animal repousa sobre uma contradição lógica”.

Charles R. Magel (1920-2014)

“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”

Mahatma Gandhi (1869-1948)

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

“Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem... Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito a ser protegida.”

São Francisco de Assis (1182-1226)

RESUMO

As propriedades variáveis e ainda desconhecidas das nanopartículas (NPs) representam um vasto campo de inseguranças e a abundância de produtos nanoestruturados no mercado faz crescer a preocupação quanto aos possíveis riscos humanos e ambientais envolvidos. Os métodos alternativos têm sido cada vez mais utilizados na avaliação toxicológica por agregarem ética e inovação tecnológica. No Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) reconheceu 25 métodos alternativos até o momento. Este trabalho buscou avaliar a aplicabilidade dos métodos alternativos reconhecidos nas Resoluções Normativas do CONCEA para a avaliação toxicológica de NPs. As bases usadas foram: Pubmed, BVS, SciELO e *Open Gray*; em português, inglês e espanhol. Os resultados abordaram testes de corrosão dérmica, irritação cutânea, fototoxicidade, sensibilização cutânea, detecção de endotoxinas e o teste de citotoxicidade para a estimativa da dose inicial para ensaios de toxicidade aguda oral sistêmica. Os ensaios da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, “*Organization for Economic Co-operation and Development*” -OECD) foram comparados a dosagens de citocinas, avaliações histopatológicas, testes de citotoxicidade 2D, testes 3D e testes *in vivo*. Os modelos de epiderme humana reconstruída (do inglês, *reconstructed human epidermis*-RHE) para a avaliação de irritação cutânea e corrosão dérmica de NPs, bem como o ensaio 3T3-NRU (corante vermelho neutro, do inglês, *neutral red uptake* - NRU) para avaliação de fototoxicidade e o ensaio do linfonodo local (do inglês, *local lymph node assay*-LLNA): 5-bromo-2-deoxiuridina(BrdU)- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) para avaliação da sensibilização cutânea, apontam convergências nas comparações realizadas entre o método alternativo e os testes paralelos. Já o 3T3-NRU para determinação de faixa de doses para estudo de toxicidade aguda oral sistêmica é aconselhável apenas como estudo de triagem. Alguns atributos de caracterização de NPs considerados essenciais pela literatura científica não foram aferidos completamente nos estudos em questão, de forma que não se exclui a possibilidade de ocorrência de viés metodológico. É urgente a formalização de protocolos específicos para testes de segurança de NPs, inclusive para os testes de citotoxicidade. Estudos que envolvem a aplicação das diretrizes metodológicas da OECD são escassos e devem ser estimulados. Com relação ao teste de endotoxina bacteriana, foram relatadas interferências na leitura óptica e nas fluorescências (causa não identificada) em decorrência das propriedades das NPs. Para evitá-las, recomendou-se o uso de árvore decisória e a realização de testes-controle. Logo, o teste de endotoxina bacteriana pode ser utilizado nos estudos com NPs, porém com ressalvas. Sabendo-

se que a despirogenização pode gerar alteração nos efeitos biológicos das NPs, sugere-se a prevenção da contaminação das NPs tanto na síntese quanto nos ensaios, por meio do uso de protocolos bem estabelecidos. Por fim, nosso estudo evidencia a necessidade de se estabelecer um processo de caracterização mais completo para as NPs, já que a confiabilidade dos resultados está, diretamente, relacionada a essa etapa preliminar.

Palavras-chave: Métodos alternativos. Nanopartículas. Controle de qualidade. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The variable and still unknown properties of nanoparticles (NPs) represent a wide range of insecurities and the abundance of nanostructured products on the market increases the worries about the possible human and environmental risks involved. Alternative methods have been increasingly used in toxicological assessment because they add ethics and technological innovation. In Brazil, the National Council of Animal Testing Control (in portuguese, *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA*) recognized 25 alternative methods until now. This work sought to evaluate the applicability of the alternative methods recognized in the CONCEA Normative Resolutions for the toxicological evaluation of NPs. The bases used were: Pubmed, BVS, Scielo and Open Gray, in Portuguese, English and Spanish. The results covered skin corrosion, skin irritation, phototoxicity, skin sensitization, cytotoxicity test to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests and Endotoxin Detection Tests. The tests recommended by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) were compared to cytokine assays, histopathological assessments, 2D cytotoxicity tests, 3D tests and *in vivo* tests. The reconstructed human epidermis (RHE) models for the assessment of skin irritation and NP dermal corrosion, as well as the 3T3-neutral red uptake (NRU) assay for phototoxicity assessment and the local lymph node assay (LLNA):5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for skin sensitization assessment show agreement between results comparing the alternative method and parallel tests. The 3T3-NRU aiming to set the dose for the oral toxicity's studies is advisable only for the screening of toxicological assessments. The 3T3-NRU for dose determination for the study of oral toxicity is advisable only for the screening of toxicological assessments. However, as some of the characterization's attributes hasn't been completely assessed by the studied articles, it's not possible to eliminate the possibility of methodological bias's occurrence. It is urgent to formalize specific protocols for NPs, including cytotoxicity tests. Studies involving the application of OECD methodological guidelines are scarce and should be encouraged. Regarding the bacterian endotoxin test, interferences in optical reading and fluorescence (unidentified cause) have been reported due to the properties of NPs. To avoid them, it was recommended to use a decision tree control tests as well. Therefore, bacterian endotoxin test can be used with reservations. Knowing that depyrogenization can generate changes in the biological effects of NPs, the use of protocols is suggested to prevent contamination of NPs, both in their synthesis and along the tests. The development of a more adequate assay for the detection of endotoxins in NPs is necessary. This study also highlights

the need for a more complete characterization process for NPs, since the reliability of the results is directly related.

Keywords: Alternative methods. Nanoparticles. Quality control. Health Surveillance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Comparação do número de artigos publicados em nanotecnologia e nanotoxicologia, em 2012 e 2013, na base de dados Pubmed.....	18
Gráfico 1 - Crescimento de produtos contendo nanomateriais no mercado, segundo o CPI, entre 2005 e 2014.....	19
Gráfico 2 - Potenciais vias de exposição para o uso normal dos produtos.....	20
Quadro 2 - Sistemas que podem ser utilizados no MAT.....	41
Quadro 3 - Principais técnicas utilizadas na caracterização de NPs	44
Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção de artigos.....	60
Figura 2 - Árvore decisória para a escolha da modalidade de teste de endotoxina bacteriana mais apropriada para a manoformulação.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos testes reconhecidos pelo CONCEA (com suas respectivas GIs), agrupados por desfecho pretendido para cada metodologia.....	24
Tabela 2 - Descritores e estratégia utilizados na busca para a recuperação de artigos nas bases de dados	51
Tabela 3 - Resultados obtidos em cada base de dados, para cada cruzamento de descritores e termos livres	55
Tabela 4 - Detalhamento dos artigos selecionados.....	61
Tabela 5 - Identificação das metodologias de interesse encontradas em cada artigo.....	62
Tabela 6 - Agrupamento dos ratos utilizados para a avaliação de MRI e ABR, após a administração transtimpânica de Ag NPS	64
Tabela 7 - Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo.....	66
Tabela 8 - Controles utilizados, testes paralelos e interferências identificadas nas guias da OECD identificadas nos resultados	88
Tabela 9 - Formas de detecção de endotoxinas utilizadas em cada artigo	96
Tabela 10- Resultados de diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana para a detecção de endotoxinas em NPs.....	97
Tabela 11 - Controles utilizados em cada teste de endotoxina bacteriana	99
Tabela 12 - Comparação dos atributos de caracterização de NPs identificados nos artigos com os que são considerados prioritários para Warheit (2008)	107

LISTA DE SIGLAS

ABR	Avaliação da Audiometria do Tronco Encefálico (<i>Auditory Brainstem Response</i>)
ADRA	Ensaio de Reatividade Química de Aminoácidos Derivados (<i>Amino Acid Derivative Reactivity Assay</i>)
AgNPs	Nanopartículas de Prata
Al ₂ O ₃ NPs	Nanopartículas de Óxido de Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP	Via de efeito adverso (<i>Adverse Outcome Pathway</i>)
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante (<i>Antioxidant Response Element</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
ATS	Estratégia alternativa de testagem (<i>Alternative Testing Strategy</i>)
AUC	Ultracentrifugação analítica (<i>Analytical Ultracentrifugation</i>)
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
BALB/c 3T3	Linhagem celular de fibroblastos murinos
BCOP	Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina (<i>Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method</i>)
BDBTD	Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações
BET	Técnica Brunauer-Emmet-Teller
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (<i>Brazilian Center for Validation of Alternative Methods</i>)
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CE	Comissão Europeia
CeO ₂ NPs	Nanopartículas de Óxido de Cério
CEUAS	Comissão de ética no uso de animais de laboratório
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPI	Inventário de Produtos Nanoparticulados (<i>Nanotechnology Consumer Products Inventory</i>)
CuONPs	Nanopartículas de Óxido de Cobre
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos

Dendrímeros de PAMAM	Dendrímeros de poliamidoamina
DL ₅₀	Dose letal 50
DPRA	Ensaio de Reatividade Peptídica Direta (<i>Direct Peptide Reactivity Assay</i>)
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (<i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPA	Agência de Proteção Ambiental Americana (<i>Environmental Protection Agency</i>)
FB	Farmacopeia brasileira
FE	Farmacopeia europeia
FeNPs	Nanopartículas de Ferro
FLTM	Teste de Permeação de Fluoresceína (<i>Fluorescein Leakage Test Method</i>)
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (<i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>)
GI	Guia internacional
GIs	Guias internacionais
HSEM	Modelo de Pele Humana Reconstruída (<i>Human Skin Equivalent Model</i>)
IBN	Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia
ICE	Teste de Olho Isolado de Galinha (<i>Isolated Chicken Eye Test</i>)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ITS	Estratégias Inteligentes Integradas (<i>Intelligent/ Integrated Testing Strategies</i>)
LAL	Lisado de Amebócitos de <i>Limulus</i>
LD	Difração a Laser (<i>Laser Diffraction</i>)
LLNA	Ensaio do Linfonodo Local (<i>Local Lymph Node Assay</i>)
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências

MAT	Teste de Ativação de Monócitos (<i>Monocyte Activation Test</i>)
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia Inovação e Comunicação
MDK	Linhagem celular Madin-Darby Canine Kidney
MDV	Máxima Diluição Válida
MRI	Avaliação de Ressonância Magnética (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MSNP	Sílica Mesoporosa (<i>Mesoporous Sílica Nanoparticles</i>)
MTT	Ensaio do corante vital {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]}
MWCN	Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla (<i>Multiwalled Carbon Nanotubes</i>)
NANoREG	Programa europeu que objetiva dar suporte científico ao processo de regulação e regulamentação
nm	Nanômetros
NP	Nanopartícula
NPs	Nanopartículas
NRU	Ensaio de Incorporação do Corante Vermelho Neutro (<i>Neutral Red Uptake Assay</i>)
<i>OAIster</i>	<i>Open Archives Initiative Protocol</i>
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>phosphate buffred saline</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PIF	Potencial de Fototoxicidade (<i>Photo Irradiation Factor</i>)
PMLANPs	Nanopartículas de ácido poli (b, L) málico (poliéster)
PMLA-PEGNPs	Nanopartículas polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
QSAR	Estudos de Relações Estrutura-Atividade Quantitativas (<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RhCE	Teste de córnea humana reconstruída (<i>Reconstructed human Cornea-like Epithelium test method</i>)
RHE	Epiderme Humana Reconstruída (<i>Reconstructed Human Epidermis</i>)
RPT	Teste de pirogênio em coelhos (<i>Rabbit Pyrogen Test</i>)

SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate-SDS</i>)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SI	Índice de Estimulação (<i>Stimulation Index</i>)
Sibratec	Sistema Brasileiro de Tecnologia
SiO ₂ NPs	Nanopartícula de Dióxido de Silício
SisNANO	Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias
SPR	Ressonância de Plasmon de Superfície (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SSA	Área superficial específica (<i>Specific Surface Area</i>)
STE	Teste de Curta Exposição (<i>Short Time Exposure</i>)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TER	Teste de Resistência Elétrica Transcutânea (<i>Transcutaneous Electrical Resistance Test Method</i>)
TiO ₂ NPs	Nanopartículas de Dióxido de Titânio
TL	Termos Livres
ULR	Unidades de Luminescência Relativa
UVA	Luz Ultravioleta A
WoE	Peso das evidências (<i>Wheight of Evidence</i>)
WST-1	Ensaio enzimático de oxi-redutase dependente de NAD (P)H celular (<i>NAD (P)H dependent cellular oxireductase enzyme assay</i>)
ZnONPs	Nanopartículas de Óxido de Zinco
3 Rs	Redução, Refinamento e Substituição (<i>Reduction, Refinement, Replacement</i>)
3T3	Fibroblastos de roedores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Métodos alternativos e a legislação brasileira	21
1.2 Metodologias alternativas reconhecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal por desfecho	27
1.2.1 Potencial de irritação e corrosão da pele	27
1.2.1.1 <i>GI OECD nº 430 – Corrosão dérmica in vitro: teste de resistência elétrica transcutânea</i>	27
1.2.1.2 <i>GI OECD nº 431 – Corrosão dérmica in vitro: teste RHE</i>	27
1.2.1.3 <i>GI OECD nº 435 – Teste de barreira de membrana in vitro</i>	28
1.2.1.4 <i>GI OECD nº 439 – Teste de irritação cutânea in vitro</i>	28
1.2.1.5 <i>GI OECD nº 437 – Teste BCOP</i>	28
1.2.1.6 <i>GI OECD nº 438 – Teste ICE</i>	29
1.2.1.7 <i>GI OECD nº 460 – Teste de permeação de fluoresceína</i>	29
1.2.1.8 <i>GI OECD nº 491 – Teste in vitro de curta exposição para diferenciar substâncias químicas que possam induzir grave dano ocular das que não requerem classificação para irritação ocular ou grave dano ocular.</i>	30
1.2.1.9 <i>GI OECD nº 492 – Teste RhCE para diferenciar substâncias químicas que não requerem classificação das que são capazes de provocar irritação ocular ou grave dano ocular</i>	30
1.2.2 Potencial de fototoxicidade	31
1.2.2.1 <i>GI OECD nº 432 – Teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU</i>	31
1.2.3 Absorção cutânea.....	32
1.2.3.1 <i>GI OECD nº 428 – Método in vitro de absorção cutânea</i>	32
1.2.4 Teste de sensibilização cutânea	32
1.2.4.1 <i>GI OECD nº 429 – Teste de sensibilização cutânea: LLNA</i>	32
1.2.4.2 <i>GI OECD nº 442A – Versão não radioativa do LLNA</i>	33
1.2.4.3 <i>GI OECD nº 442B – Versão não radioativa do LLNA (LLNA: BrdU-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).</i>	34
1.2.4.4 <i>GI OECD nº 442C – Sensibilização cutânea in chemico</i>	34
1.2.4.5 <i>GI OECD nº 442D – Teste de sensibilização cutânea in vitro</i>	35
1.2.5 Ensaio de toxicidade aguda	36
1.2.5.1 <i>GI OECD nº 420 – Toxicidade oral aguda - procedimento de dose fixa</i>	36

1.2.5.2 GIOECD n° 423 – Ensaio de toxicidade oral aguda: toxicidade aguda de classe.....	36
1.2.5.3GI OECD n° 425 – Ensaio de toxicidade oral aguda: procedimento “Up and Down”	37
1.2.5.4GI OECD n° 129 – Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade oral aguda sistêmica	37
1.2.6 Genotoxicidade.....	38
1.2.6.1 GI OECD n° 487 – Teste do micronúcleo em célula de mamífero in vitro	38
1.2.7 Toxicidade reprodutiva.....	38
1.2.7.1 GI OECD n° 421 – Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (pré e pós-natal) (reproduction/developmental toxicity screening test)	38
1.2.7.2 GI OECD n° 422 – Estudo de toxicidade de doses repetidas combinado com o teste de triagem para toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento)	39
1.2.8 Contaminação pirogênica em produtos injetáveis.....	40
1.2.8.1 Farmacopeia brasileira – teste de endotoxina bacteriana.....	40
1.2.8.2 Farmacopeia europeia – teste de ativação de monócitos.....	41
1.3 Características dos nanomateriais	41
1.4 Nanopartículas e a legislação brasileira	45
1.5 Métodos alternativos e nanotoxicologia.....	46
1.6 A classificação internacional de produtos químicos.....	46
1.7 Justificativa	47
2 OBJETIVO	49
2.1 Objetivo geral.....	49
2.2 Objetivos específicos.....	49
3 METODOLOGIA.....	50
3.1 Formulação da questão norteadora	50
3.2 Bases de dados e estratégia de busca	50
3.3 Processo de seleção dos artigos.....	53
3.3.1 Critérios de inclusão	53
3.3.2 Critérios de exclusão	53
3.3.3 Extração dos dados	54
3.4 Avaliação crítica dos resultados	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Seleção dos artigos elegíveis.....	55
4.2 Avaliação crítica dos artigos selecionados.....	60
4.2.1 Caracterização e administração das NPs	62

4.2.2 GI da OECD nº 431 – Avaliação de corrosão dérmica	74
4.2.3 GI da OECD nº 439 – Avaliação de irritação cutânea.....	76
4.2.4 GI da OECD nº 432 – Avaliação de fototoxicidade	79
4.2.5 GI da OECD nº 442-B – Avaliação de sensibilização cutânea	80
4.2.6 GI da OECD nº 129 – Avaliação de toxicidade aguda.....	82
4.2.7 Teste de endotoxina bacteriana.....	89
4.2.8 Análise da caracterização das nanopartículas.....	105
4.2.9 Perspectivas para avaliação toxicológica de nanopartículas usando métodos alternativos	110
5 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

Segundo Costa e Rozenfeld (2000), a Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o ambiente e o ambiente de trabalho e com a circulação internacional de transportes, cargas e pessoas. Atualmente, o modelo de produção capitalista acaba por gerar um consumo crescente de produtos, bens e serviços de interesse sanitário que, muitas vezes, não atendem de fato a necessidades reais. A busca incessante por lucro gera a ilusão de necessidades por meio de propagandas, que estimulam o consumo contínuo. Nesse processo estão envolvidos diversos riscos ao consumidor e ao meio ambiente, que podem não ter sido avaliados plenamente, ou que tenham sido negligenciados. A Vigilância Sanitária interfere, por isso, nas relações de produção e consumo, de modo a identificar falhas, defeitos ou ilicitudes e regular o mercado para proteger a saúde coletiva.

Nessa busca de promover, proteger, recuperar e reabilitar a saúde, conforme definido como papel da Vigilância Sanitária na Lei nº 8.080/90, há também uma forte preocupação com o desenvolvimento de novas tecnologias. Nesse contexto, podemos incluir um dos grandes desafios das ações em Vigilância Sanitária, a redução do risco relacionado à área de nanotecnologia. Conforme ilustra o Quadro 1, estudos demonstram que o conhecimento científico em nanotoxicologia avança lentamente, quando comparado, em número de publicações, ao campo da nanotecnologia (DELGADO; PAUMGARTTEN, 2013). O fato indica, que muitos produtos podem estar ganhando acesso ao mercado consumidor sem a devida avaliação do risco, ferindo o princípio da precaução (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Quadro 1 - Comparação do número de artigos publicados em nanotecnologia e nanotoxicologia, em 2012 e 2013, na base de dados Pubmed

Termos de busca	Nº de artigos	Nº de artigos em 2012	Nº de artigos em 2013*
Nanotecnologia	41.908	5.920	3.025
Nanopartícula + toxicidade	6.791	1.528	1.013
Nanotoxicologia	635	237	191

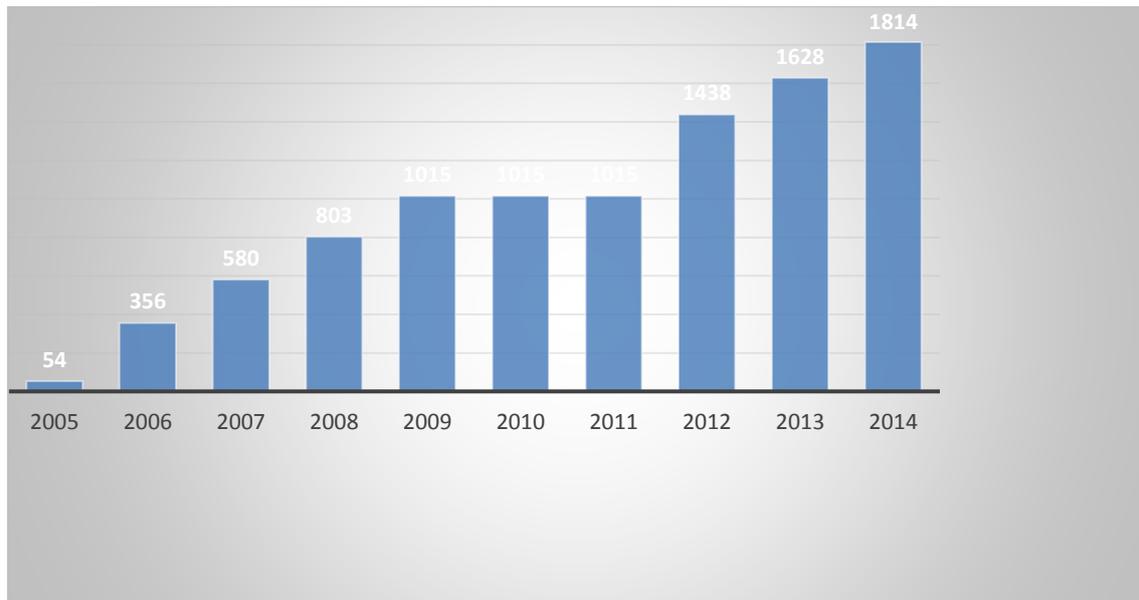
* Desde 1º de setembro de 2013.

Fonte: Adaptado de DELGADO; PAUMGARTTEN, 2013.

Em termos mundiais, altos investimentos vêm sendo observados em estudos na área da nanotecnologia, de forma que as nanopartículas (NPs) se fazem presentes em diversos setores: alimentício, eletrônico, farmacêutico, cosmético, médico-hospitalar, dentre outros, embora os efeitos potenciais no meio ambiente e na saúde humana ainda não estejam bem estabelecidos. (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010; VANCE *et al.*, 2015).

Em 2005, com o objetivo de quantificar o número de produtos contendo NPs no mercado, o *Woodrow Wilson International Center for Scholars* e o Projeto de Nanotecnologias Emergentes (do inglês, “*Project on Emerging Nanotechnologies*”) criaram um inventário de produtos nanoparticulados, o *Nanotechnology Consumer Products Inventory* (CPI). O trabalho aponta o crescimento vertiginoso do número de produtos nanoparticulados no mercado, que subiu de 54 produtos em 2005, para 1.854 em 2014, dados demonstrados no Gráfico 1 (VANCE *et al.*, 2015).

Gráfico 1- Crescimento de produtos contendo nanomateriais no mercado, segundo o CPI, entre 2005 e 2014



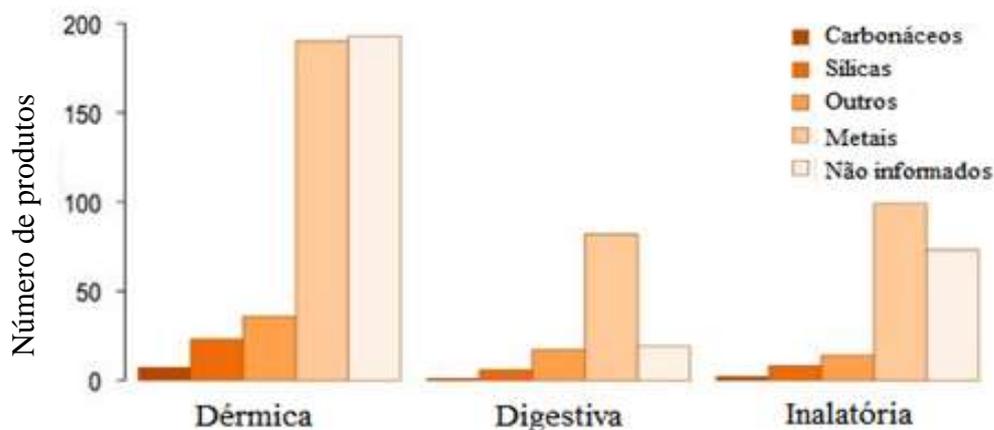
Fonte: Adaptado de VANCE *et al.*, 2015.

Dados mais atuais, obtidos no sítio eletrônico StatNano (2020), consultado em 27 de agosto de 2020, apontam 8.851 produtos nanoparticulados no mercado, fabricados por 2.445 empresas em 62 países. O setor que mais abarca produtos nanoparticulados é o de eletrônicos (1.925), seguido pela área médica em segundo lugar (1.066). Na terceira posição, os cosméticos (828) e o setor de construção (838) estão, praticamente, empatados (STATNANO, 2020). As NPs já estão presentes em toda a cadeia produtiva alimentícia, desde o cultivo dos alimentos,

passando pelo processo produtivo, até as embalagens (SINGH, 2017; STATNANO, 2020). Com o grande aumento do número de produtos registrados e, conseqüentemente, a elevação da exposição humana e ambiental, crescem as discussões em torno dos riscos potenciais envolvidos. Há, inclusive, preocupação com as possibilidades de danos à cadeia alimentar de forma cumulativa (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

A maior parte dos estudos de nanotoxicologia avalia a toxicidade de NPs por via inalatória, considerada a principal porta de entrada de nanomateriais por conta do risco ocupacional envolvido (SHATKIN; KIM, 2015). No entanto, considerando-se a grande variabilidade das formas de aplicação de nanomateriais em produtos como cosméticos e embalagens de alimentos, por exemplo, as exposições dérmica e oral também vêm crescendo em importância (STONE *et al.*, 2016). De acordo com o inventário CPI, a pele é a via de exposição para 58% dos produtos nanoparticulados, sendo esta a principal via de exposição. Considera-se que além dos líquidos e suspensões que são preparados para serem aplicados no cabelo e/ou na pele, há também os produtos sólidos que contêm NPs em sua superfície. Estudos demonstram que 16% contêm nanomateriais que podem ser ingeridos e 5% dos produtos podem ser inalados durante o seu uso normal (*spray* de cabelo, por exemplo), conforme ilustra o Gráfico 2 (VANCE *et al.*, 2015).

Gráfico 2- Potenciais vias de exposição para o uso normal dos produtos



Fonte: Adaptado de VANCE *et al.*, 2015.

Historicamente, a eficácia e a segurança de diversas substâncias e produtos vêm sendo avaliadas por meio do uso de animais de laboratório, sobretudo nos ensaios toxicológicos de medicamentos, cosméticos, saneantes, produtos biológicos, dispositivos médicos e na

determinação da potência de medicamentos biológicos (ANVISA, 2013; PRESGRAVE, 2012). No entanto, há uma tendência mundial de crescimento de grupos ligados à proteção animal e, com isso, a pressão contra o uso de animais em experimentação científica (HARTUNG *et al.*, 2001; PRESGRAVE, 2003; HASIWA *et al.*, 2013).

1.1 Métodos alternativos e a legislação brasileira

Em 1760, Fergusson já exteriorizava sua preocupação com o que ele denominava de métodos bárbaros aplicados em animais. Já no século XIX, o filósofo e jurista Jeremy Bentham (1748-1832) apresentou um pensamento no qual demonstrava que a preocupação não era se os animais podiam raciocinar, nem se eles podiam falar, mas sim, se os animais iriam sofrer (HARTUNG, 2001). O médico e fisiologista inglês Marshall Hall (1790-1857) lançou, em 1835, o que podemos definir como o primeiro código de ética na experimentação, onde ele propunha que:

- a) nenhum experimento fosse levado a cabo se as informações pudessem ser obtidas por meio de observações;
- b) nenhum experimento fosse conduzido sem um objetivo claro, preciso e passível de ser obtido;
- c) os cientistas deveriam estar bem-informados sobre o trabalho de seus antecessores, de modo a evitar qualquer tipo de repetição experimental;
- d) experimentos justificáveis deveriam ser executados levando-se em conta a menor imposição de dor possível, inclusive devendo-se utilizar organismos inferiores na escala zoológica, ou seja, menos sencientes;
- e) experimentos deveriam ser realizados de forma a produzirem resultados o mais conclusivos possível, diminuindo assim a necessidade de repetições (HALL, 1973).

Em 1954, a preocupação com o uso indiscriminado de animais na pesquisa científica e com o seu bem-estar, inspirou o surgimento de um programa que buscava a redução do número de animais utilizados na pesquisa, bem como, minimizar a dor e o desconforto, buscando alternativas para a substituição dos testes *in vivo*. Esse programa resultou na publicação do livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, por Willian Russell e Rex Burch, em 1959. A obra trazia o conceito de três princípios para o uso de animais na ciência. Por conta das iniciais em inglês de seus principais objetivos, esse programa ficou, internacionalmente, conhecido como “3Rs”: 1) Redução (do inglês, *Reduction*), 2) Refinamento (do inglês,

Refinement) e 3) Substituição (do inglês, *Replacement*), conforme Cazarin, Corrêa e Zambrone (2004). Vale ressaltar que esse programa contribuiu para a disseminação de movimentos de proteção animal e contra o uso de animais em experimentação em vários países (ROWAN; ANDRUTIS, 1990).

O Brasil seguiu a tendência mundial, primeiro na própria Constituição Federal de 1988 que estabelece no seu art. 255, a vedação explícita de práticas que submetam os animais à crueldade (BRASIL, 1988). Todavia, somente em 2008, o Brasil publicou a primeira lei que dispõe sobre o uso de animais na pesquisa científica (BRASIL, 2008), a Lei nº 11.794, de 8 de outubro, conhecida como Lei Arouca, que criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs). Para o CONCEA, a referida lei definiu as seguintes atribuições: o credenciamento das instituições para criação e/ou utilização de animais no ensino ou em pesquisas científicas, estabelecimento e revisão periódica das normas para credenciamento das instituições, uso e cuidados com os animais em pesquisa e ensino, normas de instalação e funcionamento de locais que lidam com cobaias, avaliação da introdução de técnicas alternativas substitutivas ao uso de animais e apreciação e decisão sobre recursos das CEUAs. As CEUAs são uma exigência legal para que instituições cuja atividade seja de ensino ou pesquisa possam se cadastrar no CONCEA (BRASIL, 2008). Já em 2009, o Decreto nº 6.889, de 15 de julho, regulamentador da Lei Arouca, amparado nos princípios dos 3Rs, trouxe a definição de métodos alternativos:

Procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: a) não utilizem animais; b) usem espécies de ordens inferiores; c) empreguem menor número de animais; d) utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou e) diminuam ou eliminem o desconforto. (BRASIL, 2008).

Com o propósito de apoiar o desenvolvimento de metodologias alternativas, em 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia Inovação e Comunicação (MCTIC) instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), por meio da Portaria nº491, de 3 de julho. A rede é composta por três laboratórios centrais – o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e por laboratórios associados, públicos ou particulares (RENAMA, 2012).

Em 2013, o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) foi criado, por meio da Portaria nº29 do INCQS, de 14 de agosto. Seu propósito é identificar a

necessidade da validação de novos métodos, atuar nos estudos de validação em cooperação com a RENAMA e fazer recomendações relacionadas à validação dos métodos alternativos ao CONCEA (PRESGRAVE *et al.*, 2016). Nesse mesmo ano, o MCTIC publicou a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), na Resolução Normativa (RN) nº12, de 20 de setembro. A finalidade da diretriz era garantir o cuidado e o manejo ético de animais usados para fins científicos ou didáticos. A DBCA (atualizada em 2016) ressalta as responsabilidades de todos que produzem, mantêm ou utilizam animais para:

I) garantir que a utilização de animais seja justificada; II) garantir que o bem estar dos animais seja sempre considerado; III) promover o desenvolvimento e uso de técnicas que substituam o uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica; IV) minimizar o número de animais utilizados sem comprometer a qualidade dos resultados a serem obtidos e V) refinar métodos e procedimentos buscando evitar dor ou estresse dos animais utilizados em atividades científicas ou didáticas e VI) assegurar que as condições estruturais, procedimentos operacionais e os padrões ambientais permitam que os resultados das pesquisas sejam válidos (BRASIL, 2016).

Os temas abordados pela DBCA englobam os aspectos da criação, cuidado e uso de animais para fins científicos ou didáticos, especificação das responsabilidades de usuários e instituições, detalhamento dos procedimentos operacionais, descrição do quadro de membros e as atividades das CEUAs e os procedimentos para aquisição, uso e cuidados ambientais de animais utilizados para fins científicos ou didáticos. A RN abrange os animais sob a égide da Lei Arouca (BRASIL, 2016).

O CONCEA, em 2014, publicou a RN nº17, que dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos no Brasil. A norma menciona que o reconhecimento do método alternativo validado ocorrerá por deliberação plenária do CONCEA, considerando o parecer da Câmara de Métodos Alternativos, após as considerações dos órgãos oficiais pertinentes. Além disso, estipula também que após o reconhecimento pelo CONCEA do método alternativo, o prazo limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo é de até cinco anos. Outro passo importante no panorama nacional foi a publicação de outras três Resoluções Normativas do CONCEA reconhecendo ao todo 25 métodos alternativos já publicados nas guias internacionais (GIs) da OCDE e na Farmacopeia Brasileira (FB). A RN nº18, de 24 de setembro de 2014 e a RN de nº31, de 18 de agosto de 2016, publicaram os métodos alternativos organizados de acordo com o tipo de avaliação toxicológica pretendida com cada metodologia, ou seja, por desfecho toxicológico, conforme Tabela 1. A mais recente RN é a nº45, de 22 de outubro de 2019, que reconhece o teste de ativação de monócitos (do inglês, *monocyte*

activation test - MAT). Em 2015, a ANVISA aceitou o uso dos 25 métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA em atividades de pesquisa (RDC nº35, de 7 de agosto). Dos 25 métodos, 8 utilizam animais em número reduzido e 17 são substitutivos. Um dos métodos substitutivos é considerado dessa forma porque utiliza animais invertebrados, o teste de endotoxina bacteriana, também conhecido como LAL (lisado de amebócitos de *limulus*). Dos métodos que utilizam animais, três avaliam sensibilização cutânea, três tratam de toxicidade aguda e dois de toxicidade reprodutiva.

Tabela 1- Relação dos testes reconhecidos pelo CONCEA (com suas respectivas GIs), agrupados por desfecho pretendido para cada metodologia (início).

Desfecho	Resolução normativa	Descrição do método	Nome do teste
I - Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	RN nº18 - 24/09/2014.	GI*OECD**nº430	Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : teste de resistência elétrica transcutânea.
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD**nº431	Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : teste da epiderme humana reconstruída (do inglês, <i>reconstructed human epidermis-RHE</i>).
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD**nº435	Teste de barreira de membrana <i>in vitro</i> .
	RN nº18- 24/09/2014.	GI* OECD**nº439	Teste de irritação cutânea <i>in vitro</i>

Tabela 1- Relação dos testes reconhecidos pelo CONCEA (com suas respectivas GIs), agrupados por desfecho pretendido para cada metodologia (continuação).

Desfecho	Resolução normativa	Descrição do método	Nome do teste
II - Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº 437	Teste de permeabilidade e opacidade de córnea bovina (do inglês, <i>bovine corneal opacity and permeability test method-BCOP</i>)
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº438	Teste de olho isolado de galinha (do inglês, <i>isolated chicken eyetest-ICE</i>)
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº460	Teste de permeação de fluoresceína
	RN nº31 - 31/08/2016.	GI* OECD** nº491	Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares
	RN nº31 - 31/08/2016.	GI* OECD** nº492	Teste do epitélio córneo humano reconstruído
III - Avaliação do potencial de fototoxicidade	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº432	Teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU.
IV- Avaliação da absorção cutânea	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº428	Teste de absorção cutânea <i>in vitro</i> .
V - Avaliação do potencial de sensibilização cutânea	RN nº 18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº429	Teste de sensibilização cutânea: Ensaio do linfonodo local (do inglês, <i>Local Lymph Node Assay - LLNA</i>).
	RN nº 18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº442A e nº442B	Versões não radioativas do ensaio LLNA.
	RN nº31 - 31/08/2016.	GI* OECD** nº442C	Teste de sensibilização cutânea <i>in chemico</i> .
	RN nº31 - 31/08/2016.	GI* OECD** nº442D	Teste de sensibilização cutânea <i>in vitro</i> .

Tabela 1- Relação dos testes reconhecidos pelo CONCEA (com suas respectivas GIs), agrupados por desfecho pretendido para cada metodologia (conclusão).

Desfecho	Resolução normativa	Descrição do método	Nome do teste
VI - Avaliação de toxicidade aguda	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº420	Teste de toxicidade oral aguda – Procedimento de doses fixas.
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº423	Teste de toxicidade oral aguda– Classe tóxica aguda.
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº425	Teste de toxicidade oral aguda – procedimento “ <i>up and down</i> ”.
	RN nº18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº129	Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade oral aguda sistêmica.
VII- Avaliação de genotoxicidade	RN nº 18 - 24/09/2014.	GI* OECD** nº 487	Teste do micronúcleo em célula de mamífero <i>in vitro</i> .
VIII - Avaliação de toxicidade reprodutiva	RN nº 31 - 31/08/2016.	GI* OECD** nº421	Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento.
	RN nº 31 - 31/08/2016.	GI* OECD** nº 422	Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva.
IX - Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis	RN nº 31 - 31/08/2016.	FB	Teste de endotoxina bacteriana
	RN nº45 - 22/10/2019.	FE	MAT

Fonte: elaboração própria, com base nas Resoluções Normativas nº 17, de 03 de julho de 2014; nº 18, de 24 de setembro de 2014, nº 31, de 18 de agosto de 2016 e nº 45, de 22 de outubro de 2019.

*Guia internacional

***Organization for Economic Co-operation and Development*

1.2 Metodologias alternativas reconhecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal por desfecho

As metodologias alternativas reconhecidas pelo CONCEA apresentadas na Tabela 1 estão descritas a seguir, com base nas GIs da OECD.

1.2.1 Potencial de irritação e corrosão da pele

1.2.1.1 GI OECD nº430 – Corrosão dérmica *in vitro*: teste de resistência elétrica transcutânea

A identificação de substâncias ou misturas corrosivas (capazes de gerar dano tissular irreversível, como necrose da derme e da epiderme nas áreas de contato) pode ser realizada por meio desse ensaio *in vitro*. A substância a ser testada é aplicada a três discos de pele de ratos obtidas após a eutanásia dos animais por meio de método humanitário e a análise é realizada em até 24 horas. Substâncias corrosivas alteram a estabilidade no estrato córneo, gerando assim uma redução da resistência elétrica transcutânea considerada normal. A substância é incubada com os discos de pele por 24 horas. A medida da resistência elétrica transcutânea é feita com uma ponte de *Wheatstone*. Para confirmação das substâncias positivas cujos resultados estejam próximos ao valor limite 5Ω ou menor que isso, nos casos de ausência de dano visível, utiliza-se o teste com o corante sulforodamina B. Ele se liga ao tecido lesado, indicando que houve alteração física do extrato córneo (OECD, 2020).

1.2.1.2 GI OECD nº431 – Corrosão dérmica *in vitro*: Teste RHE

Este teste tem a mesma finalidade do anterior, no entanto utiliza-se modelos de pele RHE. Os modelos de pele comercialmente disponíveis no mercado que estão incluídos nessa GI, são: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE, epiCS® e LabCyte EPI-MODEL24, cada um contendo seu procedimento operacional padronizado. O teste é baseado na capacidade de químicos corrosivos, após o contato com a RHE, penetrarem no estrato córneo por difusão ou erosão causando danos às camadas mais profundas. Assim, a viabilidade celular é avaliada por meio de conversão enzimática, de forma qualitativa pelo ensaio do corante vital MTT ou {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]}. O ensaio permite a quantificação do composto azul chamado formazan {E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-

diphenylformazan}, produzido por meio de conversão enzimática do corante pelas células viáveis. A leitura é feita por um espectrofotômetro. Os valores de viabilidade celular encontrados são usados para a classificação da substância, mas os intervalos percentuais que definem a classificação variam de acordo com o kit comercial utilizado (OECD, 2020).

1.2.1.3 GI OECD nº435 – Teste de barreira de membrana in vitro

Método *in vitro* para identificar substâncias químicas corrosivas. O teste é composto por dois componentes: uma bio-barreira sintética e um sistema de detecção química. Aplica-se a substância teste na superfície da bio-barreira e o sistema de detecção química identifica danos causados a ela, de forma semelhante ao mecanismo de corrosão na pele *in vivo*. A avaliação do sistema pode ser visual ou eletrônica (OECD, 2020).

1.2.1.4 GI OECD nº439 – Teste de irritação cutânea in vitro

A irritação cutânea é definida como a capacidade de uma substância de produzir danos reversíveis à pele. Esse teste *in vitro* quantitativo usa a RHE para identificar substâncias capazes de causar irritação cutânea. Essa GI inclui seis métodos, comercialmente, disponíveis no mercado: EpiSkin™, EpiDerm™ SkinEthic™, LabCyte, Skin+ ®, epiCS®. Após 42 horas de incubação da amostra em contato com o material teste, a viabilidade celular é quantificada por meio de conversão enzimática pelo método MTT, indicando o grau de viabilidade celular no tecido. O percentual de células viáveis define a classificação da substância. Esse método pode ser utilizado, individualmente, como substituto do teste *in vivo* ou como parte de uma abordagem estratégica de predição. Para o teste de irritação cutânea, as substâncias consideradas de baixo potencial irritante (que não precisam de categorização) devem apresentar um percentual de viabilidade celular maior que 50% após 60 minutos de exposição (OECD, 2020).

1.2.1.5 GI OECD nº437 – Teste BCOP

Teste *in vitro* capaz de identificar substâncias e misturas a serem classificadas como indutoras de graves danos oftálmicos ou não requerentes de classificação para irritação ocular ou indução de grave dano oftálmico (que não exigem nenhuma classificação). Esse último é definido por indução de dano tecidual ou grave prejuízo à visão, não reversíveis em até 21 dias

após o contato. Utiliza-se no mínimo três córneas de bovinos recém abatidos (para fins comerciais), sendo duas para controle (positivo e negativo) e outra para o teste em si. Substâncias líquidas são colocadas em contato com o olho por 10 minutos e são incubados com a córnea por duas horas a 32° C. Já os sólidos permanecem em contato por quatro horas e não carecem de incubação. Pode-se utilizar outros tempos de exposição com adequada justificativa científica. A classificação da substância é quantitativa e definida por meio de um escore de irritação *in vitro* chamado *In vitro Irritancy Score (IVIS)*, que leva em conta análises quantitativas de permeabilidade à fluoresceína e opacidade da córnea. A permeabilidade é avaliada por espectrofotometria, enquanto para a opacidade usa-se um opacitômetro. Escores menores ou iguais a três indicam substâncias que não requerem classificação para irritação ocular ou indução de grave dano oftálmico e maiores ou igual a 55,1 formam o grupo a ser classificado como indutoras de graves danos oftálmicos. Isoladamente, o teste não substitui, completamente, o teste de Draize em coelhos, mas viabiliza a substituição ao fazer parte de estratégias integradas de predição (OECD, 2020).

1.2.1.6 GI OECD n°438 –Teste ICE

O objetivo deste teste *in vitro* é o mesmo do BCOP. O princípio do teste envolve a avaliação quantitativa do inchaço e qualitativa da opacidade e da retenção de fluoresceína para posterior categorização da substância ou mistura nas categorias mencionadas. As substâncias são categorizadas em classes de ICE, que geram uma classificação de dano ocular. A histopatologia também pode ser levada em consideração, de acordo com os parâmetros da GI. Isoladamente, o teste não substitui, completamente, o teste de Draize em coelhos, mas viabiliza a substituição ao fazer parte de estratégias integradas de predição (OECD, 2020).

1.2.1.7 GI OECD n°460 – Teste de permeação de fluoresceína

Este método *in vitro* é baseado na citotoxicidade da linhagem celular *Madin-Darby Canine Kidney (MDK)*. Tem como objetivo classificar substâncias ou misturas capazes de provocar irritação severa - na qual ocorrem danos teciduais não reversíveis em até 21 dias após o contato ou grave prejuízo à visão - ou corrosão ocular, descrita como dano irreversível ao tecido ocular. A detecção de efeitos tóxicos é quantitativa ao se medir o aumento de permeabilidade à fluoresceína causado pela substância ou mistura em teste na linhagem celular

mencionada. Isoladamente, o teste não substitui completamente o teste de Draize em coelhos, mas viabiliza a substituição ao fazer parte de estratégias integradas de predição (OECD, 2020).

1.2.1.8 GI OECD nº491 – Teste in vitro de curta exposição para diferenciar substâncias químicas que possam induzir grave dano ocular das que não requerem classificação para irritação ocular ou grave dano ocular.

O teste permite a diferenciação de substâncias químicas que possam induzir grave dano ocular das que não requerem classificação para irritação ocular ou grave dano ocular. Compreende-se como grave dano ocular a produção de tecido danificado nos olhos ou decréscimo grave e irreversível da visão, conforme definição do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (do inglês, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals-GHS*). Ainda de acordo com o sistema GHS, irritação ocular refere-se à produção de alterações completamente reversíveis após o contato com a substância (OECD, 2020).

O STE consiste num teste de citotoxicidade realizado numa monocamada de linhagem celular derivada de córnea de coelho –*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC). Após cinco minutos de exposição à substância, a viabilidade celular é avaliada de forma qualitativa por meio do ensaio MTT (OECD, 2020).

Esse teste não é considerado um substituto completo para o teste *in vivo* de Draize, que avalia irritação ocular em coelhos, no entanto pode fazer parte de uma bateria de métodos alternativos como estratégia de predição (OECD, 2020).

1.2.1.9 GI OECD nº492 – Teste RhCE para diferenciar substâncias químicas que não requerem classificação das que são capazes de provocar irritação ocular ou grave dano ocular

Esse teste *in vitro* usa o epitélio RhCE, que mimetiza propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio humano. Quatro versões comerciais do teste estão incluídas nesta GI: EpiOcular™ EIT, SkinEthic™ HCE EIT, LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT, e o MCTT HCETM EIT. Desses, o EpiOcular™ EIT e o SkinEthic™ HCE EIT são considerados métodos de referência de validação (OECD, 2020).

O ensaio permite a diferenciação entre substâncias que não requerem classificação das que podem provocar irritação ou grave dano ocular. Dessa forma, se o resultado indicar que a substância não causa irritação ou dano, o teste é considerado conclusivo. No entanto, para

diferenciar substâncias causadoras de irritação das que causam grave dano ocular, é necessário utilizar outro teste. A citotoxicidade é quantificada por meio do ensaio MTT. Para cada versão comercial do teste estão definidos os parâmetros, em percentual, a partir dos quais se afere a conclusão do teste (OECD, 2020).

1.2.2 Potencial de fototoxicidade

1.2.2.1 GI OECD nº432 – Teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU

A fototoxicidade é definida como a resposta tóxica deflagrada pela administração tópica ou sistêmica de substância fotoreativa após exposição do corpo à luz ambiental. O teste busca identificar o potencial fototóxico da substância testada após exposição à luz (OECD, 2020).

As células Balb/c3T3 são mantidas em cultura por 24 horas para a formação de monocamadas e depois duas microplacas de policarbonato de 96-poços são pré-incubadas com 8 concentrações diferentes da substância. Uma delas é exposta à maior dose não citotóxica de irradiação (simulando luz solar), enquanto a outra é mantida no escuro. O teste afere a toxicidade por meio da variação de concentração do corante vermelho neutro (NRU) nas células. O NRU tem a capacidade de penetrar rapidamente por não difusão nas membranas celulares e se acumula em seus lipossomas, funcionando, nesse caso, como indicador de viabilidade celular. Alterações celulares decorrentes da ação fototóxica da substância reduzem a capacidade de penetração do NRU. A citotoxicidade é expressa pela redução concentração-dependente de NRU acumulado nos lisossomos, medida 24 horas após o tratamento com o químico testado e a radiação. É possível distinguir células viáveis, danificadas e mortas. Ao final, para a interpretação dos resultados, calcula-se o potencial de fototoxicidade (*Photo Irradiation Factor* - PIF) e o *Mean Photo Effect* (MPE). O primeiro é calculado por meio da comparação da concentração das respostas obtidas no claro e no escuro, geralmente usando o índice de irradiação– concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%, o (IC₅₀) (OECD, 2020).

$$\text{PIF} = \text{IC}_{50} \text{ na ausência de irradiação} / \text{IC}_{50} \text{ na presença de irradiação.}$$

O MPE é calculado com base na comparação da curva dose-resposta completa, pela seguinte fórmula:

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{e_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Assim, é possível classificar a substância como “não fototóxica”, “provavelmente fototóxica” ou “fototóxica” (OECD, 2020).

1.2.3 Absorção cutânea

1.2.3.1 GI OECD nº 428 – Método *in vitro* de absorção cutânea

Esse método fornece informação sobre a absorção cutânea. A substância testada é marcada e aplicada a uma amostra de pele que separa duas câmaras de uma célula difusora, sendo uma delas doadora e a outra receptora. O produto permanece em contato com a pele por um tempo específico, em determinadas condições, antes da remoção por procedimento apropriado. Geralmente, mais de uma concentração é utilizada, buscando mimetizar de forma realista a exposição humana. A absorção da substância teste é avaliada após um determinado período de tempo, geralmente 24 horas. Retira-se amostras do fluido receptor durante o experimento para posterior detecção da substância ou metabólitos. Mede-se a absorção da substância teste no fluido receptor e sua distribuição no sistema, de forma que o perfil de absorção ao longo do tempo deve ser apresentado. Para algumas substâncias o teste *in vitro* pode não ser suficiente, portanto, é possível combiná-lo com outro teste de absorção cutânea *in vivo* da OECD. Esse teste pode não ser aplicável a todas as classes de substâncias. É possível usar a pele de diferentes mamíferos, inclusive a do homem (OECD, 2020).

1.2.4 Teste de sensibilização cutânea

1.2.4.1 GI OECD nº 429– Teste de sensibilização cutânea: LLNA

Os testes de sensibilização cutânea buscam identificar o potencial alergênico da substância testada. As GIs da OECD que envolvem o estudo dos linfonodos locais murinos são resultado de uma revisão da GI original nº 429, à luz dos novos conhecimentos adquiridos na

área de bem-estar animal. Trabalham com a redução do número de animais utilizados por substância testada, reduzem o *stress* e a dor, oferecendo, portanto, o refinamento do procedimento (OECD, 2020).

O princípio básico do teste é a proliferação de linfócitos nos linfonodos faciais de camundongos da cepa CBA, induzida após o agente dermosensibilizante ser aplicado na região auricular dos animais em teste. A proliferação é proporcional à dose aplicada e ao potencial de sensibilização do alérgeno aplicado. Para a quantificação da dermosensibilização, administra-se marcadores radioativos na veia caudal e cinco horas depois, realiza-se a eutanásia dos animais e disseca-se os linfonodos auriculares. A avaliação do potencial dermosensibilizante se dá pela dosagem de radioisótopos de timidinatritiada (^3H -timidina) ou iodo incorporados ao DNA das células em proliferação. O experimento envolve medições e observações clínicas diárias. É realizado com um mínimo de três grupos com diferentes doses da substância teste (mais um de controle negativo e um positivo), com um mínimo de quatro camundongos em cada grupo e dura seis dias. Depois disso, os animais são eutanasiados e uma suspensão com células dos linfonodos é preparada. A relação entre a proliferação encontrada em cada grupo tratado e a do grupo controle, determina o Índice de Estimulação (*Stimulation Index* - SI). Quando o SI é maior ou igual a três, a substância testada é classificada como potencial causador de sensibilização cutânea (OECD, 2020).

1.2.4.2 GI OECD nº442A – Versão não radioativa do LLNA

Este ensaio é uma das variações não radioativas do LLNA. Tem o mesmo objetivo, o mesmo princípio, e é também realizado com um mínimo de três grupos experimentais com diferentes doses da substância teste (mais um de controle negativo e um positivo), com um mínimo de quatro camundongos em cada grupo, mas a duração do teste é um pouco mais longa. Difere do anterior com relação ao método da dosagem da proliferação de linfócitos, realizada por meio da contagem de adenosina trifosfato (ATP) por bioluminescência (como indicador de proliferação). Após a eutanásia dos animais, a dosagem de ATPs não deve ultrapassar 30 minutos. O método luciferina/luciferase deve ser utilizado para medir a bioluminescência em Unidades de Luminescência Relativa (ULR). A relação entre a proliferação de linfócitos encontrada em cada grupo tratado e a do grupo controle determina o SI. Quando o SI é maior ou igual a 1,8, a substância testada é classificada como potencial causadora de sensibilização cutânea (OECD, 2020).

1.2.4.3 GI OECD n°442B – Versão não radioativa do LLNA (LLNA: BrdU- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Essa é outra versão não radioativa do ensaio LLNA. Tem o mesmo objetivo, o mesmo princípio e é também realizado com um mínimo de três grupos experimentais com diferentes doses da substância teste (mais um de controle negativo e um positivo), com um mínimo de quatro camundongos em cada grupo e dura seis dias (OECD, 2020).

No Dia 1 do experimento, aplica-se a substância teste no dorso de cada orelha dos animais. No Dia 5, faz-se a injeção intraperitoneal de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). A substância é um análogo não radioativo da ³H-timidina, que é incorporado pelo DNA de células em multiplicação (de forma similar àquela). No Dia 6, após 24 horas da injeção do BrdU, os animais são eutanasiados e os linfonodos são dissecados e analisados. A incorporação de BrdU nas células de linfonodos auriculares é analisada por meio de kits comerciais BrdU-ELISA. A avaliação consiste na medição individual em cada grupo testado comparada a medição obtida no grupo tratado apenas com o veículo. Ao final, calcula-se o SI. Resultados maiores ou iguais a 1,6 são considerados positivos.

Na ausência de informação sobre a dose máxima da substância teste a ser usada, a GI recomenda um teste de triagem para a definição, antes do teste principal (OECD, 2020).

1.2.4.4 GI OECD n°442C–Sensibilização cutânea *in chemico*

Este procedimento trata de um teste de citotoxicidade que permite a diferenciação entre substâncias capazes ou não de provocar sensibilização cutânea, que envolve uma reação de hipersensibilidade na área de contato (dermatite alérgica de contato) com a substância testada (GHS). Para essa avaliação, a GI preconiza dois testes *in chemico*, que buscam identificar a ocorrência de eventos-chave desencadeadores do mecanismo responsável pelo evento adverso em si, isto é, pelo aparecimento da sensibilização cutânea (do inglês, *Adverse Outcome Pathway-AOP*). Cabe esclarecer que a via de ação para a ocorrência desses eventos-chave já foi identificada e resumida. Parte importante desse processo é a ligação covalente a proteínas endógenas: o ensaio de reatividade direta peptídica (do inglês, *Direct Peptide Reactivity Assay–DPRA*) e o teste de ensaio de reatividade química de aminoácidos derivados (do inglês, *Amino Acid Derivative Reactivity Assay-ADRA*) medem exatamente a ocorrência dessa etapa do AOP. No entanto, considerando que a ligação covalente a proteínas é apenas o primeiro evento deflagrador no processo de sensibilização cutânea, a GI recomenda que o método não seja

utilizado individualmente, mas como parte de estratégias integradas inteligentes (do inglês, *Intelligent Testing Strategies-ITS*) que abordem/identifiquem outros mecanismos relevantes no aparecimento de sensibilização cutânea. O teste não pode ser utilizado para a avaliação de substâncias/compostos metálicos. A classificação é possível por meio da quantificação fotométrica da depleção peptídica (dos aminoácidos lisina e cisteína) após o contato com a substância testada. Resultados entre zero e 6,38% são considerados negativos (OECD, 2020).

1.2.4.5 GI OECD nº 442D–Teste de sensibilização cutânea *in vitro*

Assim como o item anterior, este procedimento permite a diferenciação entre substâncias capazes ou não de provocar sensibilização cutânea, que envolve uma reação de hipersensibilidade na área de contato (dermatite alérgica de contato) com a substância testada (GHS). Para esta avaliação de citotoxicidade, a GI preconiza dois testes *in vitro* que buscam indicar a ocorrência do segundo evento-chave desencadeador dos mecanismos de AOP para sensibilização cutânea (atualmente já identificados), chamado ativação de queratinócitos: o teste ARE-Nrf2 luciferaseKeratinoSens™ e o teste ARE-Nrf2 luciferaseLuSens. Os testes usam uma linhagem celular aderentes derivadas de células imortalizadas (de humanos no ARE-Nrf2 luciferaseKeratinoSens™ e de ratos, no ARE-Nrf2 luciferaseLuSens) contendo o gene da enzima Luciferase. É sabido que danos que geram processos oxidativos, como lesões ou inflamações (assim como os provocados por sensibilizadores de pele), induzem a expressão de determinados genes que expressam a produção de antioxidantes, objetivando proteção contra os danos gerados pelos processos oxidativos (RYAN *et al.*, 2004). Tais genes são controlados pelo elemento de resposta antioxidante (do inglês, *antioxidant response element- ARE*). O fator nuclear (Nrf2) é um fator de transcrição envolvido no mecanismo de resposta antioxidante, que ao se combinar com o ARE, inicia a transcrição gênica. A enzima Luciferase (catalizadora que transforma energia química em luminosa) está presente nas linhagens celulares dos testes, sob controle transcricional de um promotor fusionado com o elemento ARE. Dessa forma, a expressão de antioxidantes fica vinculada à produção de luminescência e permite a quantificação da viabilidade celular. Cada teste possui uma forma individual de avaliação dos resultados (OECD, 2020).

No entanto, considerando que o ensaio envolve apenas o segundo evento deflagrador de sensibilização cutânea, a GI recomenda que o método não seja utilizado individualmente, mas como parte de ITSs que abordem/identifiquem outras formas informações que apontem outros mecanismos relevantes dos AOPs de sensibilização cutânea (OECD, 2020).

1.2.5 Ensaio de toxicidade aguda

1.2.5.1 GI OECD n° 420 – Toxicidade oral aguda - procedimento de dose fixa

Este método permite a identificação de efeitos adversos induzidos *in vivo*, assim como a classificação de substâncias quanto ao seu potencial de causar toxicidade aguda. Tem como foco o estudo de dosagens moderadamente tóxicas, logo, doses causadoras de morte em roedores devem ser evitadas. Doses fixas de 5, 50, 300 ou 2.000 mg/kg de peso corpóreo (excepcionalmente 5.000 mg/kg) são administradas em dose única ou fracionada, num intervalo máximo de 24 horas, a grupos de animais do mesmo sexo. As doses causadoras de toxicidade, assim como aquelas que geram sinais de toxicidade sem causarem efeitos tóxicos severos ou morte, são identificadas por observação. Outros grupos de animais podem ser utilizados para doses fixas mais altas ou mais baixas, quando necessário. O procedimento termina quando a dose causadora de toxicidade evidente ou morte é identificada, quando não são observados efeitos tóxicos em doses elevadas ou ainda quando ocorrem mortes na menor dosagem. A substância é administrada em dose única por meio de intubação gástrica. O estudo tem duração de 14 dias e inclui medições, tais como registro de ganho de peso corpóreo e observações de sinais clínicos. Ao final desse período, os animais são submetidos à necropsia e a análise histopatológica deve ser realizada (OECD, 2020).

1.2.5.2 GI OECD n° 423 – Ensaio de toxicidade oral aguda: TA de classe

Cada etapa deste ensaio usa apenas três animais. O teste envolve uma sequência de procedimentos, nos quais o resultado de um determina qual será a próxima etapa, podendo não ser necessários mais testes, ser necessário testar outro grupo de animais em nova etapa com a mesma dose ou testar outro grupo de animais com a próxima dose mais alta ou mais baixa. Dependendo da mortalidade ou do estado crítico de saúde que se encontrem, uma média de dois a quatro procedimentos serão necessários para avaliar a toxicidade da substância testada. Esse método usa poucos animais e permite o ranqueamento de substâncias de forma similar à de outros com o mesmo fim. Baseia-se em avaliações biométricas com doses fixas adequadamente definidas para classificação quanto à toxicidade e à avaliação de risco. Assim como no procedimento de dose fixa, a substância é administrada em dose única por meio de intubação gástrica. O estudo tem duração de 14 dias e inclui medições, tais como registro de ganho de

peso corpóreo e observações de sinais clínicos. Ao final desse período, os animais são submetidos à necrópsia e a análise histopatológica deve ser realizada (OECD, 2020).

1.2.5.3 GI OECD nº425 – Ensaio de toxicidade oral aguda: procedimento “up and down”

O método usa roedores para calcular uma estimativa da dose letal para 50% da população na qual a dose foi administrada (DL_{50}) com um intervalo de confiança e permite a classificação toxicológica da substância de acordo com as normas internacionais harmonizadas. Esse procedimento permite a redução do número de animais requeridos para esse fim, além de fornecer dados relacionados à toxicidade por observação. Há duas formas: o teste limite e outro principal. O primeiro pode ser utilizado com eficiência para substâncias cuja suspeita de toxicidade é baixa (indicado quando se tem informações que sugiram a baixa toxicidade, enquanto o segundo é mais útil nos casos em que não se tem informação nenhuma sobre toxicidade ou quando há informações disponíveis que indiquem toxicidade (OECD, 2020).

Os animais são testados, individualmente, em sequência, geralmente com um intervalo de 48 horas. O primeiro animal é testado com uma dosagem um pouco abaixo da dose suspeita de causar toxicidade aguda. Caso morra, o próximo animal é testado com dose inferior e caso sobreviva, com dose superior. Os animais são observados com especial atenção durante as quatro primeiras horas após a administração da substância e seguem sob observação, geralmente, durante 14 dias, com aferição diária do peso corpóreo. Todos os animais são submetidos à necropsia. Mundialmente, a DL_{50} é calculada por meio da estimativa de máxima verossimilhança (tipo de tratamento estatístico), para determinar intervalos estimados para a DL_{50} – quanto mais estreito for o intervalo, melhor é a estimativa da DL_{50} (OECD, 2020).

A guia para ensaios de toxicidade oral aguda da OECD orienta sobre a escolha da GI de toxicidade oral aguda mais adequada para cada caso.

1.2.5.4 GI OECD nº 129 – Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade oral aguda sistêmica

Este é um ensaio *in vitro* que se baseia na capacidade de absorção e retenção do NRU por fibroblastos de roedores (3T3) ou queratinócitos da epiderme humanas (NHK). Substâncias a serem testadas são colocadas em contato com as células em cultura por 48 horas e após o enxágue, as células são incubadas com o NRU. Nos casos em que houver lesão, a viabilidade celular será afetada e, conseqüentemente, o corante não ficará retido. Como a concentração de

corante é, diretamente, proporcional ao número de células vivas, a citotoxicidade é expressa pela redução da absorção do NRU, que é quantificada por espectrofotometria, num formato dose-resposta, em busca do IC₅₀. O IC₅₀ encontrado é colocado numa equação que permite estimar o valor da DL₅₀ oral, favorecendo a redução do número de animais necessários. O uso desse teste em abordagens do tipo peso das evidências (*Wheight of Evidence* - WoE) para abordar a dose inicial de procedimentos objetivando avaliação de toxicidade usando animais pode reduzir o número de indivíduos utilizados, e para substâncias de maior toxicidade, pode reduzir o número de animais que morram durante o teste ou que requeiram eutanásia. Para a estimativa de doses iniciais, dados *in vitro* devem ser considerados em conjunto com outras avaliações, como por exemplo, estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (do inglês, *quantitative structure-activity relationship*-QSAR), DL₅₀ de substâncias relacionadas, dentre outros (OECD, 2020).

1.2.6 Genotoxicidade

1.2.6.1 GI OECD n°487 – Teste do micronúcleo em célula de mamífero *in vitro*

O teste do micronúcleo *in vitro* busca verificar efeitos tóxicos sobre o material genético das células. Culturas de células humanas ou de outros mamíferos são expostas à substância teste. Durante ou após a exposição, as células são incubadas por tempo suficiente para que possam ocorrer danos cromossômicos ou outros efeitos no ciclo de divisão celular que possam levar à formação de micronúcleo (MN). O MN é formado quando o material genético sofre fragmentação (podendo ser formado de cromossomos inteiros ou fragmentos) gerando uma estrutura similar à do núcleo no citoplasma, ao lado dele, na intérfase. Essa estrutura representa dano que foi transmitido às células filhas – a incidência de células binucleadas indicará o potencial genotóxico (OECD, 2020).

1.2.7 Toxicidade reprodutiva

1.2.7.1 GI OECD n° 421–Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (pré e pós-natal) (*reproduction/ developmental toxicity screening test*)

Este teste *in vivo* permite o rastreamento de efeitos toxicológicos de substâncias químicas no processo reprodutivo de ambos os sexos, em roedores. A substância teste é

administrada em doses graduais para grupos de machos e fêmeas, sendo recomendado que cada grupo tenha um mínimo de 10 animais, devendo ser mantida a proporção de um macho para cada fêmea. Recomenda-se também três grupos teste e um controle. Machos devem ser tratados por no mínimo quatro semanas, enquanto fêmeas devem ser expostas a substância teste durante o período completo de estudo, aproximadamente 63 dias. A seleção das doses a serem administradas devem ser definidas com base em informações preliminares obtidas em estudos de toxicidade ou de resultados de estudos de doses repetidas. Os animais são avaliados desde o período anterior ao acasalamento, até um mínimo de 14 dias de lactação. A substância é administrada, diariamente, por via oral. O resultado deste estudo deve aferir: observações clínicas, ganho de peso corporal, consumo de água e alimentos, monitoramento do ciclo estral, observação de parâmetros e medições da prole, dosagem do hormônio tireoidiano e dados de necrópsia e histopatologia. Animais sobreviventes serão sacrificados para necropsia ao final do estudo e os que morrerem ao longo do processo também deverão ser necropsiados. Os achados deste estudo devem ser avaliados em termos de efeitos observados, necrópsia e achados microscópicos. A histopatologia dos testículos e do epidídimo também deve ser considerada, em função do curto período de tratamento dos machos (OECD, 2020).

1.2.7.2 GI OECD nº422– Estudo de toxicidade de doses repetidas combinado com o teste de triagem para toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento)

Este teste permite o rastreamento de efeitos toxicológicos de substâncias químicas no processo reprodutivo de ambos os sexos, em roedores. A substância testada é administrada em diferentes níveis de doses a grupos de machos e fêmeas. Cada grupo deve ter um mínimo de 10 machos e 10 fêmeas, com pelo menos um grupo controle (veículo) e três grupos teste, sendo o rato a espécie recomendada. Machos devem ser medicados por no mínimo quatro semanas e fêmeas ao longo de todo o estudo, aproximadamente 54 dias. A substância teste deve ser administrada por intubação gástrica. Os níveis de dose a serem administrados devem ser definidos com base em informações de estudos de toxicidade ou toxicocinética disponíveis. O teste limite corresponde a 1.000 mg/kg de peso corpóreo. O resultado deste estudo deve incluir: observações diárias detalhadas (incluindo reações sensoriais a estímulos), registro do peso corporal, consumo de água e alimentos e dados de necrópsia e histopatologia. Os achados deste estudo devem ser avaliados em termos de efeitos observados, dados da necropsia e achados microscópicos. A avaliação deverá incluir a relação entre a dose administrada e a presença ou ausência de observações (OECD, 2020).

1.2.8 Contaminação pirogênica em produtos injetáveis

1.2.8.1 FB – teste de endotoxina bacteriana

Este teste, também conhecido como *lisado de amebócitos do Limulus* (LAL), foi incorporado à FB em 1996 (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003) e utiliza a hemolinfa do caranguejo ferradura (MAGALHÃES *et al.*, 2007). Há diversos métodos de teste de endotoxina bacteriana, que são variações de três versões básicas: método de gelificação, turbidimétrico e cromogênico.

No primeiro, após a extração, coloca-se a hemolinfa do caranguejo *Limulus Polyphemus* em contato com igual quantidade da substância a ser testada e incuba-se a 37° C por 1 hora. Na presença de endotoxinas ocorre a formação de um coágulo e a inversão do tubo, sem que o conteúdo esorra, é indicativo de positividade. Já na versão cromogênica, um cromóforo é adicionado ao complexo endotoxina-LAL. Ao ser ativada pela endotoxina, a cascata de coagulação do teste de endotoxina bacteriana gera a liberação da proteína de cor amarela, de forma que a cor obtida é proporcional à quantidade de endotoxina presente (MORALES, 2004). Há duas versões de teste de endotoxina bacteriana cromogênico: cromogênico *endpoint* e cromogênio cinético. O primeiro está baseado na relação entre a concentração de endotoxina e a quantidade do cromóforo liberado no final de um período de incubação. O segundo está baseado na medida do tempo de reação necessário para a mistura da reação atingir uma determinada absorvância ou na velocidade de desenvolvimento de cor (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). A leitura final da quantidade de endotoxina é, geralmente, obtida por meio de espectrofotometria, mas é possível fazer uma leitura qualitativa lendo as amostras, visualmente no teste de endotoxina bacteriana cromogênico limite (MORALES, 2004). Uma outra versão do teste cromogênico limite, também conhecida como Diazo, é uma extensão do resultado limite de proteína (MORALES, 2004). A proteína livre se deriva para formar um Diazo composto colorido. As versões turbidimétricas envolvem a medida do aumento de turbidez, decorrente da formação de coagulina insolúvel, monitorada espectrofotometricamente (MORALES, 2004). O teste limite turbidimétrico está baseado na relação entre a concentração de endotoxina e a turbidez (absorvância ou transmissão) da reação. Já o cinético turbidimétrico está baseado no tempo de reação necessário para a mistura da reação atingir uma absorvância pré-determinada ou na relação de desenvolvimento de turbidez (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

1.2.8.2 FE – MAT

O MAT é um teste de pirogênio *in vitro* que se baseia nos mecanismos de resposta febril do organismo, fornecendo resultados por meio da quantificação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Podem ser usadas diferentes matrizes de células e *readouts* (desfechos) (Quadro 2) (MONOCYTE..., 2010). O suplemento da Farmacopeia Europeia (2017) reconheceu o MAT como um método substitutivo para produtos validados, internacionalmente, ou quando o produto tiver sido comparado caso a caso ao teste *in vivo*, respeitando as limitações de cada produto.

Quadro 2 - Sistemas que podem ser utilizados no MAT

Teste	Sistemas	Desfecho
WB/IL1 β	WB (<i>Whole Blood</i>) Sangue humano total	Dosagem de Interleucina 1 β
Cryo WB/IL-1 β	Cryo WB (<i>Cryopreserved Whole Blood</i>) Sangue humano total criopreservado	Dosagem de Interleucina 1 β
WB/IL1 β	WB Sangue humano total	Dosagem de Interleucina 6
PBMC/IL-6	PBMC (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>) Células Mononucleares do Sangue Periférico	Dosagem de Interleucina 6
MM6/IL-6	Linhagem celular monocítica Monomac 6	Dosagem de Interleucina 6

Fonte: CALDEIRA, 2015.

1.3 Características dos nanomateriais

O termo nanotecnologia refere-se a uma área científica em plena expansão, caracterizada, principalmente, pela síntese de moléculas, cujo tamanho esteja entre 1 e 100 nanômetros (nm) (WARHEIT *et al.*, 2008). Embora o termo venha sendo utilizado como designação de algo muito moderno no meio científico, diversos nanomateriais já vinham sendo utilizados industrialmente há décadas, sem mencionar as NPs, sabidamente, existentes no ambiente natural. O que é de fato muito novo no que se refere à nanotecnologia são as novas formas de síntese e caracterização (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Para melhor compreensão, se faz necessário esclarecer termos recorrentes relacionados ao assunto. O termo NPs refere-se às partículas que possuam pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica (JEEVANANDAM *et al.*, 2018). Já um nanomaterial é descrito como um material natural produzido acidentalmente ou fabricado que contém

partículas soltas, agregadas ou aglomeradas, no qual 50% ou mais das partículas apresentam, na distribuição granulométrica, uma ou mais dimensões externas no intervalo 1-100 nm (COMISSÃO EUROPEIA, 2019). NPs são também divididas em três categorias principais: i) ambientais, geradas no meio ambiente (como as encontradas em organismos, insetos, plantas, animais, no corpo humano e em vulcões, por exemplo); ii) não engenheiradas, aquelas resultantes da ação humana (como incinerações) e iii) engenheiradas, que são as intencionalmente produzidas pelo homem, como por exemplo, para o uso em diagnóstico por imagem. Nanomateriais engenheirados podem ser puros ou compostos por moléculas diferentes, possibilitando uma alta variabilidade de materiais e aplicações (HA,2013; JEEVANANDAM *et al.*, 2018).

NPs são classificadas conforme sua dimensão, morfologia, composição, uniformidade e aglomeração. De acordo com sua dimensão, podem ser classificadas como 1D, quando se tratar de partículas que recobrem filmes ou superfícies finas. Já as NPs 2D são nanoestruturas ligadas a um substrato de forma estável ou partículas livres cuja razão de aspecto seja alta, enquanto os nanomateriais 3D possuem essas três diferentes dimensões. Morfologicamente, as NPs podem ser denominadas conforme seu formato achatado, esférico ou segundo relação área/superfície. As de alta razão de aspecto são os nanotubos ou nanofios (em diversos formatos), enquanto as de baixa razão de aspecto são esféricas, ovais, cúbicas, dentre outras formas. Já quanto à composição, NPs podem constituir-se de um ou mais nanomateriais (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007). Dentre outras várias formas de categorização de NPs, uma das mais difundidas leva em conta suas características físico-químicas e define cinco classes: NPs de carbono, metálicas, cerâmicas, semicondutoras, poliméricas e lipídicas (KHAN *et al.*, 2017).

No grupo de NPs de carbono os principais são fulerenos e nanotubos de carbono. São materiais de grande interesse comercial para o uso como nanocargas (SAEED; KHAN, 2014, 2016), gás para tratamento ambiental (NGOY *et al.*, 2014) e meio de suporte para catálises orgânicas e inorgânicas (MABENA *et al.*, 2011). Já as NPs metálicas possuem características opticoelétricas¹ específicas. Tais propriedades permitem inúmeras aplicações, como o uso de

¹opticoelétricas- Em nanopartículas metálicas com diâmetro menor que o comprimento de onda incidente, um campo eletromagnético (luz) numa determinada frequência, induz a oscilação de elétrons metálicos livres por meio da NP. Essa oscilação é chamada de ressonância de plasmon de superfície (surface plasmon resonance-SPR), e é explicada pela teoria de Mie (KREIBIG, 1995). Para os metais nobres, a ressonância encontra-se em frequências visíveis (LINK; EL-SAYED, 2006). A oscilação dos plasmons de superfície dos elétrons metálicos resulta no aumento da absorção e do espalhamento de radiação eletromagnética em ressonância com a frequência SPR das NPs de metais nobres, gerando cores intensas e interessantes propriedades ópticas (MIE, 1908).

NPs de ouro (AuNPs) no diagnóstico por imagem e no tratamento fototérmico do câncer (PRASHAN *et al.*, 2007) e o uso da prata como antimicrobiano em medicamentos e produtos de uso doméstico (ASHA RANI *et al.*, 2009). NPs de cerâmica são um material inorgânico não metálico (SIGMUND *et al.*, 2006) que pode ser empregado em catálises e em imagens na área biomédica (THOMAS *et al.*, 2015). Já o grupo de semicondutores possui propriedades entre metais e não metais e inúmeras aplicações, como em fotocátalises e em equipamentos eletrônicos (SUN, 2000). NPs poliméricas são em geral orgânicas (KHAN *et al.*, 2017) e podem ser utilizadas em sistemas de distribuição de medicamentos (ABD ELLAH; ABOUELMAGD, 2016). Um bom exemplo é o *delivery* de drogas antineoplásicas, maximizando a quantidade de medicamento que atinge o tumor, reduzindo a exposição dos locais não alvo de tratamento (ABOUELMAGD; YEO, 2016). A classe de NPs, cuja base é lipídica é, amplamente, empregada na área biomédica, como por exemplo, carreadores de drogas (PURI *et al.*, 2009) e nas terapias de câncer, por meio do silenciamento dos genes relacionado à doença (GUJRATI *et al.*, 2014). Por fim, dependendo das características químicas ou eletromagnéticas, as NPs podem se apresentar dispersas ou aglomeradas (partículas magnéticas tendem a se aglomerar, por exemplo) e neste último caso, podem se comportar como partículas grandes, dependendo do tamanho do aglomerado (BUZEA; BLANDINO; ROBBIE, 2007).

Na década de 1990, estudos envolvendo a exposição *in vivo* a NPs demonstrou que os roedores expostos a material nanoparticulado, em relação ao grupo experimental exposto ao composto original, apresentavam respostas inflamatórias e fibrose pulmonar em maior grau, mesmo em níveis de doses equivalentes (WARHEIT *et al.*, 2007). As variações de comportamento de partículas em escala nanométrica acontecem por conta de alterações em suas propriedades físico-químicas, em função de sofrerem maior manifestação do efeito quântico e pelo fato de terem sua proporção entre superfície e volume alterada. Esta última gera mudanças nos efeitos de superfície, já que são os átomos de superfície os que reagirão com o meio no qual o material está inserido (PIMENTA; MELO, 2007). Já se sabe também que duas NPs de um mesmo material e tamanho podem apresentar diferentes capacidades de agregação, estabilidade e reatividade (WARHEIT *et al.*, 2007). A vantagem do uso de NPs está, justamente, no fato de terem suas propriedades diversificadas, conferindo mais versatilidade e eficácia aos produtos, e permitindo novas aplicações. Como exemplo, podemos citar alterações de cor, de condutividade elétrica e de solubilidade de determinados materiais, à medida que vão sofrendo reduções em escala nanométrica. Por outro lado, passou-se, então, a suspeitar da possibilidade da toxicidade das NPs serem também diferentes da do composto original (WARHEIT *et al.*, 2008).

Por conta da variabilidade das NPs e suas propriedades, pesquisas que envolvam o assunto demandam sua correta caracterização, para que se obtenha dados mais concretos e confiáveis sobre seu comportamento (HARTUNG; SABBIONI, 2011). Embora, comumente, os parâmetros dosimétricos aferidos sejam o peso, o número de partículas e a área de superfície de NPs, o formato, as propriedades eletrofísicas e revestimentos de superfícies, não costumam ser descritos adequadamente nos estudos (HARTUNG; SABBIONI, 2011).

De acordo com Warheit (2008), boas práticas de estudos toxicológicos de NPs deve compreender sua caracterização físico-química com relação ao seu tamanho, distribuição do tamanho, área de superfície, cristalinidade, revestimento de superfície, reatividade de superfície, método de síntese do nanomaterial e pureza da amostra. Para isso, utiliza-se algumas técnicas específicas, relacionadas no Quadro 3.

Quadro 3- Principais técnicas utilizadas na caracterização de NPs

Técnica	Aplicação / Características
Difração de raios-X	Estrutura cristalina, tamanho da partícula (LIMBACH, 2005).
Espalhamento dinâmico de luz	Tamanho de partículas (suspensão), distribuição por tamanhos (BOOTZ <i>et al.</i> , 2004).
Sedimentação por centrifugação	Distribuição dos tamanhos das partículas/completo (BOOTZ <i>et al.</i> , 2004).
Cromatografia de exclusão por tamanho	Boa resolução, pequeno volume de amostra/lenta (POWERS <i>et al.</i> , 2006).
Microscopia de força atômica	Boa resolução/imagens 3D, só analisa a superfície (POWERS <i>et al.</i> , 2006).
Área superficial específica (Brunauer-Emmet-Teller-BET)	Tamanho das partículas, área superficial/simples- considera as partículas como esferas monodispersas (POWERS <i>et al.</i> , 2006).
Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	Morfologia da superfície, tamanho das partículas/boa resolução (BOOTZ; SCHUBERT; KREUTER, 2004)
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	Estrutura local e morfologia (POWERS <i>et al.</i> , 2006).
Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)	Composição da superfície e mapeamento elementar (POWERS <i>et al.</i> , 2006).
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)	Análise química da superfície (POWERS <i>et al.</i> , 2006).

Fonte: Adaptado de PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010.

Considerando a complexidade do tema, em outubro de 2011, a Comissão Europeia (CE) adotou uma recomendação de alteração da definição de NPs. Nessa última atualização da definição, a medição da distribuição do tamanho de todas as partículas primárias que possuam de 1-100 nm presentes na amostra é exigida, independentemente de estarem livres ou como parte de um aglomerado (CALZOLAI; GILLILAND; ROSSI, 2012). O fato tem gerado um impacto em muitas áreas diferentes da legislação, como o Regulamento Europeu dos Produtos Cosméticos, onde as atuais definições de nanomaterial terão que ser rediscutidas. A CE também apontou a necessidade de ajustes apropriados dos métodos analíticos, a fim de identificar, corretamente, os nanomateriais considerando os muitos desafios no processo analítico. Outro ponto a ser destacado na nova recomendação é a interação de NPs com constituintes da matriz, seu potencial de acumulação e agregação e a ampla variedade de matrizes, existindo a necessidade de abordagens analíticas integradas. Além disso, há uma necessidade urgente de ferramentas de garantia de qualidade, tais como métodos validados e materiais de referência incluindo as NPs na matriz final (STAMM *et al.*, 2012).

1.4 NPs e a legislação brasileira

Em 2013, buscando promover a inovação na indústria brasileira e o desenvolvimento econômico e social, criou-se a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN). Desde então, o MCTIC tem executado uma série de ações de promoção e fomento à nanotecnologia. A participação do país no programa europeu NANoREG (que objetiva dar suporte científico ao processo de regulação e regulamentação de nanomateriais) e a criação do Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia-SisNANO, são exemplos da atuação do ministério (MCTIC, 2020). Mais recentemente, na Portaria nº 3459, de 26 de julho de 2019, do MCTIC, a IBN foi instituída como política nacional para o desenvolvimento da nanotecnologia, um marco legal da nanotecnologia no país. A saúde, a nanosseguurança e os alimentos constam como parte dos temas priorizados. As ações e programas estratégicos e estruturantes definidos pela IBN foram: I) Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO); II) redes do Sistema Brasileiro de Tecnologia (Sibratec) relacionadas à nanotecnologia; III) programa de certificação de nanoprodutos; IV) redes de pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia; V) ambientes promotores de inovação, como parques tecnológicos, incubadoras e aceleradoras de empresas, centros de inovação, dentre outros; e VI) cooperações internacionais envolvendo nanotecnologias (BRASIL, 2019).

1.5 Métodos alternativos e nanotoxicologia

Hartung e Sabbioni afirmaram em 2011: “A nanotoxicologia ainda não está estabelecida [...], mas o campo de métodos alternativos pode fornecer ferramentas úteis no que diz respeito a inovação tecnológica, garantia da qualidade, validação e aceitação regulatória.” Diversos métodos *in vitro* já validados permitem adaptação para o emprego de NPs, embora, até o momento - 10 anos após a publicação de Hartung e Sabbioni- não tenham sido ainda validados com tal finalidade. Dentre eles, pode-se mencionar: corrosão dérmica, irritação cutânea, absorção cutânea, irritação ocular, toxicidade aguda, genotoxicidade e pirogenicidade. Esses testes podem ser usados como triagem (substituindo ou minimizando o uso de animais) ou de forma integrada, numa bateria, os chamados métodos alternativos integrados (do inglês, “*Alternative Testing Strategies*” (ATS-), podendo fornecer informações sobre toxicocinética e estudos metabólicos, caracterização físico-química dos materiais testados e perfil toxicológico em modelos celulares (HARTUNG; SABBIONI, 2011). Dentre os métodos mais relevantes utilizados como parte de ATS, pode-se mencionar o uso de métodos *in vitro* (combinados com *in chemico* e *in silico*), *ex vivo* e *in silico*. Como ferramentas de avaliação do risco, pode-se citar: *WoE*, ITS e AOP. A primeira é utilizada como instrumento para a tomada de decisão quando, por exemplo, se tem dados *in vitro*, mas não se tem os dados *in vivo*, então as evidências são discutidas e analisadas (HRISTOZOV *et al.*, 2014). As ITS combinam dados e ferramentas analíticas buscando esclarecer perguntas que permitam reduzir a necessidade de testar cada formulação. Já as AOPs procuram identificar os diferentes eventos-chave deflagradores de uma determinada sequência de novos eventos que culmina num efeito adverso. Dessa forma, os métodos alternativos serão fundamentais para o esclarecimento dos mecanismos de ação dos eventos toxicológicos (ANKLEY *et al.*, 2010).

1.6 A classificação internacional de produtos químicos

O Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (do inglês, *Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* -GHS), foi desenvolvido, principalmente, pelas seguintes instituições: Organização das Nações Unidas (ONU), Organização Internacional do Trabalho, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), e o Subcomitê de Especialistas em Transportes de Produtos Perigosos por estradas da ONU. De acordo com o sítio eletrônico do GHS: “O Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos

Químicos estabelece critérios harmonizados para classificar substâncias e compostos com relação aos perigos físicos, para a saúde e para o meio ambiente.” O sistema inclui, além disso, elementos harmonizados para informar dos perigos, com os requisitos sobre a rotulagem, pictogramas e fichas de segurança. O uso de produtos químicos com diversas substâncias, composições e finalidades é uma realidade no mundo atual. Esse fato gerou a necessidade de informação e regulação para os usuários desses produtos. Considerando o processo de globalização, as diferenças entre países na forma de classificar e comunicar os perigos tornou o processo confuso e menos seguro, pois dificultava a identificação dos perigos pela rotulagem (UN, 2011).

Por isso, dentre os objetivos do sistema GHS estão:

- i) Elevar a proteção à saúde humana e ambiental, permitindo um sistema internacionalmente compreensível para a comunicação dos perigos;
 - ii) Prover um sistema reconhecido aos países que não possuíam nenhum tipo de classificação/ regulamentação;
 - iii) Reduzir a necessidade de testes para a avaliação de substâncias químicas, e
 - iv) facilitar o comércio internacional de substâncias químicas que tenham sido avaliadas e testadas em critérios internacionais”
- (UN, 2011).

Os critérios estabelecidos no GHS estão baseados no que descreve o documento chamado Livro Púrpura (GHS, 2020).

Em se tratando de métodos alternativos, geralmente não é possível que se possa classificar o perigo de determinadas substâncias com um único teste. Por isso, diversas GIs da OECD indicam a necessidade de ITSs, nas quais se usa métodos alternativos combinados para que se alcance a adequada classificação da substância.

1.7 Justificativa

Com o uso crescente de NPs em diversos produtos, de diferentes segmentos do mercado, cresce também a exposição humana e ambiental. As propriedades peculiares, altamente variáveis e ainda desconhecidas das NPs representam um vasto campo de dúvidas e conseqüentemente, de inseguranças, sob o ponto de vista toxicológico. Essa situação mostra a necessidade de atenção especial na avaliação do risco destes materiais. A avaliação da toxicidade de NPs ainda é um campo novo e pouco estudado em relação a nanotecnologia e ao surgimento de novas moléculas. Os métodos alternativos, por sua vez, têm sido cada vez mais utilizados na avaliação toxicológica de ingredientes e produtos por serem métodos que agregam

ética e inovação tecnológica nos processos regulatórios. Entretanto, existem poucos dados sobre a transição do uso dos métodos alternativos atualmente existentes para aplicação na área de nanotoxicologia. Assim, este estudo torna-se relevante na medida em que reúne, por meio de uma revisão bibliográfica, as informações disponíveis na literatura especializada com uma análise crítica sobre o tema. O reconhecimento legal dos 25 métodos alternativos pelo CONCEA acelera a necessidade de avaliação quanto à plausibilidade destes métodos serem aplicados ao estudo de NPs, como ferramenta na avaliação específica desse campo de aplicação.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade dos métodos alternativos reconhecidos nas Resoluções Normativas do CONCEA para a avaliação toxicológica de NPs.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar estudos que utilizaram as metodologias publicadas nas RNs do CONCEA para avaliar toxicidade de NPs;
- b) Condensar os resultados dos estudos selecionados, segundo o objeto do estudo;
- c) Identificar os métodos com os quais as NPs vêm sendo caracterizadas, bem como, quais características vêm sendo reportadas;
- d) Elencar os testes realizados paralelamente aos métodos alternativos objeto de estudo;
- e) Identificar métodos que sejam indicados como promissores (ou não), pelos autores, para o uso em NPs;
- f) Classificar os métodos alternativos pelos princípios dos 3Rs, como: redução, refinamento ou substituição;
- g) Analisar os resultados encontrados nas publicações, considerando o objeto de estudo, levantando entraves e desafios relacionados ao tema.

3 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão narrativa de literatura, que possui caráter amplo e visa descrever e discutir o “estado da arte” de determinado tema, sob o ponto de vista teórico ou contextual, por meio de análise e interpretação da produção científica existente (ROTHER, 2007). Essa síntese de conhecimentos a partir da descrição de temas abrangentes favorece a identificação de lacunas de conhecimento para subsidiar a realização de novas pesquisas.

3.1 Formulação da questão norteadora

O início do percurso metodológico desta revisão partiu da elaboração da questão norteadora, ou seja, do problema de pesquisa, que foi construída com base numa adaptação no mnemônico PICO, desenvolvido pela Fundação *Cochrane*, no qual P refere-se à população ou Problema, I à intervenção, C a controle ou comparação e O a resultados (do inglês, *outcomes*) (COCHRANE HANDBOOK, 2009; SANTOS, PIMENTA, NOB, 2007).

Essa adaptação foi feita porque o I (intervenção) e o C (controle) são aspectos referentes à área médica, enfermagem e afins, não cabendo para o estudo em questão. Para esta etapa, foi utilizada a técnica PVO (RAMOS, 2015), onde P –refere-se à situação-problema, participantes ou contexto; V –aponta para as variáveis do estudo e O –refere-se ao resultado esperado pelo estudo.

Desse modo, na construção da pergunta para a busca bibliográfica de evidências foram utilizados:

P = Métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA;

V =Avaliação toxicológica de NPs;

O=Identificar os métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA que podem ser utilizados na avaliação toxicológica de NPs,

Utilizando-se a técnica PVO, chegou-se à seguinte questão norteadora: “É possível aplicar os métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA na avaliação toxicológica de NPs?”

3.2 Bases de dados e estratégia de busca

As buscas foram realizadas nas bases PubMed, BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), *SciELO* (do inglês, *Scientific Eletronic Library*), *OAIster* (do inglês, *Open Archives Initiative*

Protocol) e BDBTD (Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações); essa última tendo sido incluída para identificar estudos da literatura cinzenta (trabalhos não publicados, resumos, teses e capítulos de livros). Foram utilizados os descritores (DECs e MeSH) — palavras-chave para recuperação dos assuntos na literatura — e termos livres (TL) — termos não encontrados no DECs e no MeSH, mas de relevância para a pesquisa. Os termos foram utilizados conforme a estratégia de busca apresentada na Tabela 2.

Tabela 2- Descritores e estratégia utilizados na busca para a recuperação de artigos nas bases de dados selecionados (início)

Termos e estratégias de busca*
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND toxicology
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanotoxicology
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND skin
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND skin
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND eye
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND eye
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND phototoxicity
animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND phototoxicity

Tabela 2- Descritores e estratégia utilizados na busca para a recuperação de artigos nas bases de dados selecionados (conclusão)

Termos e estratégias de busca*
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “toxicity tests, acute”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “toxicity tests, acute”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “acute toxicity”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “acute toxicity”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND genotoxicity
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND genotoxicity
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “mutagenicity tests”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “mutagenicity tests”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “reproductive toxicity”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “reproductive toxicity”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “pyrogens”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “pyrogens”
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles OR nanomaterials AND “limulus ameocyte lysate” OR “monocyte activation test”

* Na plataforma BVS, as aspas foram substituídas por parênteses. No filtro relacionado à base de dados selecionou-se a MEDLINE e o no filtro de assunto principal, selecionou-se: NPs, alternativas aos testes em animais e testes de toxicidade.

Fonte: A autora, 2019.

Os cruzamentos desses descritores foram realizados em língua inglesa, com filtros para a recuperação de artigos em português, inglês e espanhol. Não se utilizou nenhum tipo de restrição temporal. As buscas foram realizadas entre 01/02/2020 e 01/03/2020.

3.3 Processo de seleção dos artigos

A triagem dos artigos foi realizada com base nos títulos e resumos dos estudos recuperados e suas correlações com o objeto de estudo. Para a seleção final, realizou-se a leitura dos trabalhos na íntegra.

3.3.1 Critérios de inclusão

Os estudos foram selecionados com base nos seguintes critérios de inclusão:

- I) publicações nos idiomas português, inglês e espanhol;
- II) trabalhos que abordassem o uso de metodologias alternativas constantes das RNs n° 18/14, n° 31/16 e n°45/19 do CONCEA, para os mesmos desfechos destas RNs e na avaliação toxicológica de NPs;
- III) estudos que não tivessem mencionado as GIs da OECD como fonte metodológica, mas que tivessem informado utilizar os protocolos metodológicos dos kits comerciais recomendados pelas RNs (GIs da OECD) foram incluídos neste trabalho, desde que estivessem de acordo com o item I) e,
- IV) estudos cujos testes constassem das RNs, mesmo que não tivessem sua fonte metodológica identificada pelo autor, desde que, após um processo comparativo, tenham sido considerados de acordo com a metodologia descrita nas GIs da OECD pelos autores do presente estudo. Sempre condicionando a inclusão ao item I).

3.3.2 Critérios de exclusão

Os fatores de exclusão utilizados no processo de seleção dos estudos foram:

- I) publicações em duplicata;
- II) estudos de revisão da literatura e capítulos de livros;
- III) trabalhos que utilizassem análises, tipos celulares ou kits comerciais que não os recomendados pelas normas de interesse, ainda que possuíssem os mesmos desfechos das GIs da OECD objeto deste trabalho e informassem sua fonte metodológica como sendo alguma(s) da(s) normas recomendadas pelas RNs, e
- IV) publicações que abordassem o uso de estratégias integradas de método alternativos

3.3.3 Extração dos dados

A extração dos dados foi realizada de acordo com os objetivos específicos pretendidos. Assim, ficou definida a extração dos seguintes dados, para cada estudo encontrado nos resultados:

- Identificação das NPs estudadas em cada artigo;
- Forma física das NPs utilizadas;
- Doses e concentrações utilizadas;
- Atributos aferidos na caracterização das NPs;
- Métodos utilizados para a caracterização das NPs;
- Controles utilizados;
- Interferências identificadas decorrentes da utilização de NPs;
- Formas de superar as interferências descritas, quando mencionadas;
- Identificação dos testes objeto de estudo;
- Testes realizados paralelamente àqueles objetos de estudo;
- Conclusão dos autores sobre a aplicabilidade do teste objeto de estudo;
- Testes não objeto de estudo que tenham sido identificados pelos autores como promissores.

3.4 Avaliação crítica dos resultados

Ao longo do estudo buscamos verificar que tipos de comparações foram feitas em relação às metodologias utilizadas e se havia convergências ou divergências nos resultados e os motivos destas, quando identificadas. Procuramos também identificar interferências relatadas, suas causas e possíveis alternativas para evitá-las. Além disso, verificamos os processos de caracterização das NPs e discutimos os resultados frente ao que encontramos na literatura técnico-científica como exemplo de adequação e boas práticas, de modo a garantir confiabilidade dos estudos de avaliação nanotoxicológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos artigos elegíveis

Foi encontrado um total de 1.429 estudos. Desses, 1.384 foram recuperados nas bases de dados - 452 provenientes da Pubmed, 932 da BVS, 1 da SciELO e 44 na literatura cinzenta-cinco da BDBTD e 39 do OAIster. Do total, eliminamos 466 artigos que se encontravam em duplicata, de forma que restaram 963. Após a leitura dos resumos destes, 946 artigos foram eliminados conforme os critérios de inclusão e exclusão definidos, de forma que 17 artigos seguiram para a leitura completa. Dentre eles, 8 foram considerados elegíveis para serem analisados criticamente (Tabela 3). Dentre os 9 artigos excluídos, os motivos para a eliminação de acordo com os critérios inclusão e exclusão foram:

- i) O uso de análises, tipos celulares ou kits comerciais que não constam das GIs da OECD (três artigos);
- ii) Uso dos testes que constam nas RNs do CONCEA para desfechos diferentes dos definidos nas RNs (quatro artigos);
- iii) Uso de estratégias integradas (um artigo);
- iv) Estudos de revisão (um artigo).

O fluxograma do processo de seleção de artigos foi representado na Figura 1.

Tabela 3- Resultados obtidos em cada base de dados, para cada cruzamento de descritores e termos livres (início)

Termos de busca	PUBMED	BVS *	SciELO	BDBTD	OAIster
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles **	104	728	1	5	13
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials	112	55	0	0	10
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND toxicology	30	1	0	0	0

Tabela 3- Resultados obtidos em cada base de dados, para cada cruzamento de descritores e termos livres (continuação)

Termos de busca	PUBMED	BVS *	SciELO	BDBTD	OAIster
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanotoxicology	21	11	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR alternative methods” AND nanoparticles AND skin	104	42	0	0	16
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND skin	9	1	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND eye	5	13	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND eye	3	1	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND phototoxicity	0	5	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND phototoxicity	0	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “toxicity tests, acute”	3	2	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “toxicity tests, acute”	3	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “acute toxicity”	8	9	0	0	0

Tabela 3- Resultados obtidos em cada base de dados, para cada cruzamento de descritores e termos livres (continuação)

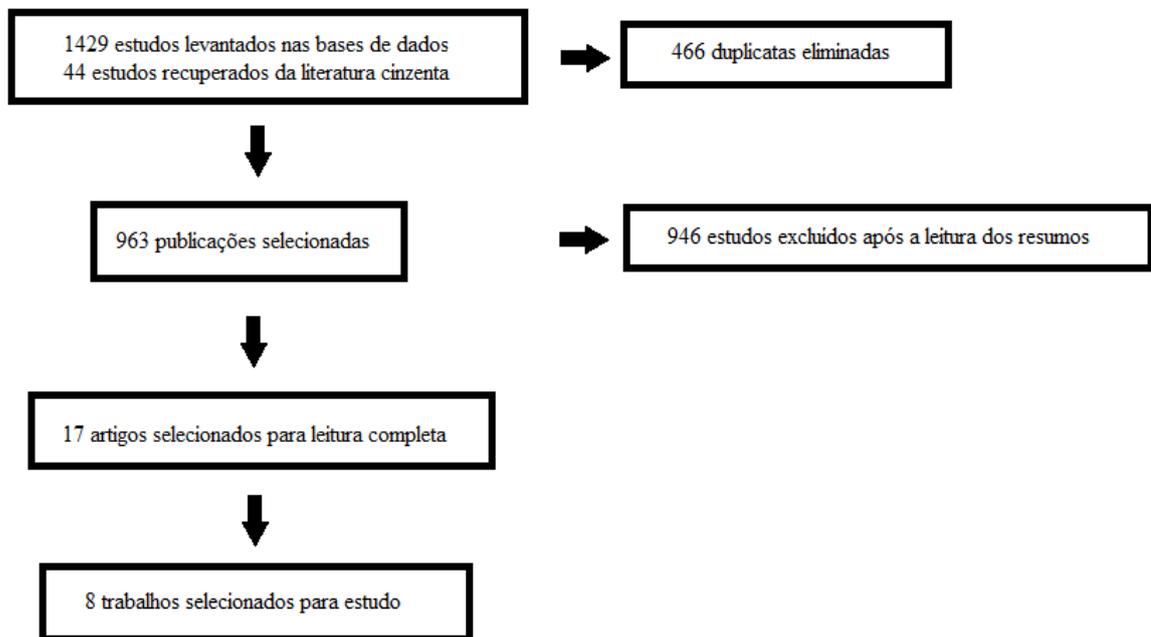
Termos de busca	PUBMED	BVS *	SciELO	BDBTD	OAIster
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “acute toxicity”	3	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND genotoxicity	1	6	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND genotoxicity	2	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “mutagenicity tests”	1	2	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “mutagenicity tests”	1	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “reproductive toxicity”	1	1	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “reproductive toxicity”	0	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles AND “pyrogens”	0	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanomaterials AND “pyrogens”/	0	0	0	0	0
“animal use alternatives” OR “animal testing alternatives” OR “alternative methods” AND nanoparticles OR nanomaterials AND “limulus ameocyte lysate” OR “monocyte activation test”	41	55	0	0	0

Tabela 3- Resultados obtidos em cada base de dados, para cada cruzamento de descritores e termos livres (conclusão)

Termos de busca	PUBMED	BVS *	SciELO	BDBTD	OAIster
TOTAL	452	932	1	5	39

Fonte: A autora, 2019.

Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção de artigos



Fonte: A autora, 2020

4.2 Avaliação crítica dos artigos selecionados

Todos os artigos selecionados foram publicados em língua inglesa. O estudo mais antigo foi publicado em 2010 e o mais recente, em 2018 (Tabela 4). A ausência de artigos publicados antes de 2010 e após 2018 neste trabalho se justifica pelo fato de terem sido excluídos ao longo do processo seletivo, baseado em critérios de inclusão e exclusão bem definidos.

Tabela 4 - Detalhamento dos artigos selecionados

Número do artigo	Título	Ano	Periódico	Autores
#1	<i>Skin corrosion and irritation of nanoparticles using Reconstructed Three-dimensional Human skin model, EpiDerm™</i>	2016	<i>Toxicological research</i>	Hyejin Kim, Jonghye Choi, Handule Lee, Juyoung Park, Byung-II Yoon, Seon Mi Jin e Kwangsik Park
#2	<i>Analysis for the Potential of Polystyrene and TiO₂ Nanoparticles to Induce Skin Irritation, Phototoxicity, and Sensitization.</i>	2011	<i>Toxicology in vitro</i>	Park, Yoon-Hee, SangHoonJeong, Sang Min Yi, ByeongHyeok Choi, Yu-Ri Kim, In-Kyoung Kim, Meyoung-Kon Kim, e SangWook Son.
#3	<i>Toxicity of silver nanoparticle in rat ear and BALB/c 3T3 cell line</i>	2014	<i>Journal of Nanobiotechnology</i>	Jing Zou, Hao Feng, MarikaMannerström, TuulaHeinonen, IlmariPykkö
#4	<i>The Applicability of Conventional Cytotoxicity Assays to Predict Safety/Toxicity of Mesoporous Silica Nanoparticles, Silver and Gold Nanoparticles and Multi-Walled Carbon Nanotubes.</i>	2016	<i>Toxicology in vitro</i>	Mannerström, Marika, Jing Zou, Tarja Toimela, IlmariPykkö e TuulaHeinonen.
#5	<i>Ambiguities in applying traditional Limulus Amebocyte Lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations.</i>	2010	<i>Nanomedicine</i>	Marina A Dobrovolskaia, Barry W Neun1, Jeffrey D Clogston, Hui Ding, Julia Ljubimova e Scott E McNeil
#6	<i>LAL Test and Rabbit Pyrogen Test (RPT) for Endotoxin Detection of CPT-11/DSPE-MPEG2000 Nanoformulation: What If Traditional Methods Are Not Applicable?</i>	2018	<i>Asian Journal of Pharmaceutical Sciences</i>	Jin, Yanan, Juanjuan Jia, Chan Li, JianqiXue, Jiabei Sun, Kaiyuan Wang, Yaling Gan, Jing Xu, Yaqin Shi, e Xingjie Liang
#7	<i>Interference of Silica Nanoparticles with the Traditional Limulus Amebocyte Lysate Gel Clot Assay.</i>	2014	<i>Innate Immunity</i>	Kucki, Melanie, Christian Cavelius, e Annette Kraegeloh.
#8	<i>Contamination of nanoparticles by Endotoxin: Evaluation of Different Test Methods.</i>	2012	<i>Particle and Fibre Toxicology</i>	Smulders, Stijn, Jean-Pierre Kaiser, Stefano Zuin, Kirsten L. Van Landuyt, LuanaGolanski, JeroenVanoirbeek, Peter Wick, e Peter Hm Hoet.

Fonte: A autora, 2020

De um total de 25 metodologias identificadas, foram encontradas apenas seis que constam nas RNs. Identificou-se um artigo que trata de irritação cutânea (GI OECD nº439) e corrosão dérmica (GI OECD nº 431), um que trata de irritação cutânea (GI OECD nº439), fototoxicidade (GI OECD nº432) e sensibilização cutânea (GI OECD nº 442B), dois que tratam de toxicidade aguda (GI OECD nº 129) e quatro que tratam da detecção de endotoxinas – FB (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Identificação das metodologias de interesse encontradas em cada artigo

Número do artigo	Desfecho	Metodologia de interesse
<i>Artigo#1</i>	Corrosão dérmica Irritação cutânea	- GI OECD nº 431 - GI OECD nº439
<i>Artigo#2</i>	Irritação cutânea Fototoxicidade Sensibilização cutânea	- GI OECD nº 439 - GI OECD nº 432 - GI OECD nº 442B
<i>Artigo#3</i>	Toxicidade aguda	- GI OECD nº 129
<i>Artigo#4</i>	Toxicidade aguda	- GI OECD nº 129
<i>Artigos#5 a #8</i>	Detecção de endotoxinas	-FB (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019) -teste de endotoxina bacteriana

Fonte: A autora, 2019.

A OECD apresenta guias contendo tanto metodologias *in vivo*, quanto de redução e refinamento (*in vivo/in vitro*) e de substituição (*in vitro*). A GI OECD nº 442B (sensibilização cutânea) é o único teste *in vivo* objeto de estudo dentre os resultados encontrados. Os demais artigos realizaram apenas métodos *in vitro*, para a substituição do uso de animais: GIs nº 439 (irritação cutânea), nº 431 (corrosão dérmica), nº 432 (fototoxicidade) e nº 129 (toxicidade aguda) da OECD e o teste de endotoxina bacteriana. Os artigos #2 e # 3 realizaram o experimento *in vivo* comparativamente.

4.2.1 Caracterização e administração das NPs

Diferentes formas de caracterização e administração de NPs foram utilizadas nos artigos encontrados ao longo deste estudo.

O artigo #1 avaliou a toxicidade de NPs de ferro (FeNPs), NPs de óxido de alumínio ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$), NPs de dióxido de titânio (TiO_2NPs) e NPs de prata (AgNPs) (GIs OECD n° 431 para corrosão dérmica e 439 para irritação cutânea). FeNPs e TiO_2NPs e AgNPs foram adquiridas em pó (AgNPs dispersa em polivinilpirrolidona-PVP). As $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ foram diluídas em água, conforme recomendação do fabricante. Os autores fizeram a caracterização das partículas por TEM para FeNPs (35 a 45 nm), AgNPs (<100nm) e $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ (30-60 nm). TiO_2NPs (partículas primárias de 20 nm) foram fornecidas pela OECD e os autores reportaram os dados informados pela organização. Todas as NPs foram administradas nos tecidos da mesma forma que foram adquiridas, com exceção para $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$, que foi diluída de acordo com a orientação do fabricante, antes de ser administrada. A distribuição do tamanho das NPs foi avaliada por TEM. Foram mencionados os graus de pureza, das FeNPs e da AgNPs, mas este dado não foi informado para as TiO_2NPs e as $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$. Os autores informaram o *status* de agregação apenas para TiO_2NPs , dados fornecidos pela OECD, doadora da NP. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7. Utilizou-se NPs em pó, 25 mg, conforme orientação da GI, que foram administradas sobre o modelo cutâneo. Observou-se leve agregação quando as NPs foram colocadas em contato com a superfície da pele. Para as ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$) a concentração aplicada foi de 50 μL (conforme orientação da GI).

O artigo #2 avaliou NPs de poliestireno (tamanho médio 50 nm) e TiO_2NPs (tamanho médio <25 nm) (GIs OECD n° 431 para corrosão dérmica, n° 432 para fototoxicidade e n° 442B para sensibilização cutânea). Os autores fizeram a caracterização identificando a composição química e distribuição de tamanho das NPs por TEM. Para as NPs de poliestireno utilizou-se: no ensaio MTT, concentrações entre 1-1.000 $\mu\text{g/ml}$, bem como no modelo HSEMS, enquanto no teste de Draize utilizou-se 0,5 ml na concentração de 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Já nas TiO_2NPs foram utilizadas concentrações entre 25 e 1.000 $\mu\text{g/ml}$ no MTT e entre 1 e 100 $\mu\text{g/ml}$ no modelo HSEMS e 0,5 ml na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, no teste de Draize (Tabela 7).

O artigo #3 avaliou o potencial de toxicidade de AgNPs (tamanho médio= 100 nm) e AgNO_3NPs (tamanho médio= 100 nm) (GI OECD n° 129 para TA). Segundo os autores, a caracterização completa das NPs seria publicada separadamente, no entanto, o documento não foi localizado por nós. Uma das técnicas utilizadas para a caracterização de NPs foi SEM, para a avaliação morfológica e de tamanho. Já os atributos de tamanho hidrodinâmico e potencial zeta, foram aferidos por DLS (Tabela 7).

Dentre os testes de citotoxicidade realizados pelo artigo #3, está o 3T3-NRU-GI OECD n° 129, que estima a dose inicial para teste de toxicidade oral sistêmica. Além deste, os autores

executaram ainda, usando a mesma linhagem celular (Balb/c3T3) o ensaio enzimático de oxireductase dependente de NAD (P)H celular (*NAD (P)H* (do inglês, *dependent cellular oxireductase enzyme assay*- WST-1), a dosagem de ATP celular total e coloração de iodeto de propídio. Os estudos *in vitro* envolveram oito concentrações diferentes, sendo a faixa final de estudo 0,67-10,0 µg/ml. O meio celular contendo 10% de água deionizada foi usada como controle do veículo. No ensaio *in vivo* desenvolvido pelo artigo #3, 40 µl de soluções de 200, 2.000 e 4.000 µg/ml de cada NPs estudada foram injetadas por via transtimpânica na nos ratos. Utilizou-se 14 ratos machos pesando entre 287 g e 524g para a avaliação de ressonância magnética (do inglês, *magnetic resonance imaging*- MRI) e 14 ratos machos pesando entre 330 e 410 g para a avaliação da audiometria do tronco encefálico (do inglês, *auditory brainstem response*- ABR), conforme Tabela 6. Os autores informaram a estabilidade das AgNPs em perilinfa artificial, uma vez que a perilinfa seria o principal fluido com o qual as NPs teriam contato após sua administração.

Tabela 6 - Agrupamento dos ratos utilizados para a avaliação de MRI e ABR, após a administração transtimpânica de (Ag NPs)

Medições	Número de ratos expostos a variadas concentrações de (Ag NPs) em tempos diferentes									
	400 µg/ml				200 µg/ml*				2000µg/ml	
	5h	2d	4d	7d	5h	2d	4d	7d	5h	7d
MRI	2	-	-	2	7	-	-	-	5	5
ABR	-	7	7	7	-	7	7	7	-	-

Três * ratos que receberam injeções de 400 µg/ml de AgNPs foram agrupados no grupo de 200 µg/ml no estudo de MRI.

Fonte: Zou *et al.*, 2014.

O artigo #4 testou a aplicabilidade de métodos, tradicionalmente, usados para produtos químicos para a determinação de toxicidade de NPs em diferentes tipos celulares de mamíferos. Utilizou-se AuNPs (13 ± 1 nm), AgNPs (20 ± 7 nm), MWCN (tamanho= 10 ± 1 nm) e dois tipos de NPs de sílica mesoporosa (do inglês, *mesoporous sílica nanoparticles*-MSNP) (MSNP1= 212 ± 52 nm e MSNP2= 239 ± 50 nm) em fibroblastos Balb/c 3T3, usando o ensaio 3T3-NRU-GI OECD n° 129, que estima a dose inicial para teste de toxicidade oral aguda

sistêmica. Paralelamente, as mesmas NPs foram testadas em outros tipos celulares, usando o ensaio WTS-1 (Tabela 7).

Os autores publicaram um quadro com a caracterização das NPs na forma adquirida do fornecedor, que contempla composição química, superfície de área avaliada por teste de endotoxina bacteriana (apenas para as MSPN1 e MWCNT), tamanho médio e hidrodinâmico, avaliado por TEM e DLS, morfologia, cobertura, potencial zeta e a forma física. Publicaram também os resultados da avaliação do potencial zeta e do potencial hidrodinâmico após o contato com o meio celular de cada ensaio. De acordo com os dados informados, os autores identificam que o tamanho das MSNPs 1 e 2 ultrapassam 100 nm, o que vai de encontro à definição das nanopartículas. MSNP1, MSNP2 e MWCNT foram fornecidos em pó, enquanto AgNPs e AuNPs, em suspensão aquosa (Tabela 7).

O artigo #5 testou AuNPs estabilizadas em citrato, NPs de ácido poli(*b*,L-málico) (PMLANPs), NPs de polietilenoglicol (PMLA-PEGNPs) e dendrímeros de poliamidoamina (dendrímeros de PAMAM) em diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana. A caracterização das NPs foi feita por DLS, para avaliação do tamanho hidrodinâmico e avaliação do potencial zeta, a fim de determinar o potencial eletrostático de superfície (Tabela 7). Os autores mencionam o processo de síntese das PMLA-PEGNPs, bem como sua purificação para evitar a presença de endotoxinas, pelo método Aida e Pabst.

O artigo #6 testou a detecção de endotoxinas numa nanoformulação micelar antineoplásica contendo cloridrato de irinotecano e *DSPE-mPEG*₂₀₀₀ (1, 2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-metoxi-polietilenoglicol), por meio do teste de endotoxina bacteriana gelificação e do RPT. A imagem da nanoformulação foi feita por TEM, enquanto o tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta foram avaliados por DLS. A eficiência de encapsulação também foi avaliada. Os autores publicaram em separado um documento com a descrição da síntese e a caracterização da nanoformulação; documento localizado por nós (LI *et al.*, 2016), conforme Tabela 7.

O artigo #7 buscou avaliar a capacidade do teste de endotoxina bacteriana, na versão gel, em identificar adequadamente a presença de endotoxinas nas NPs. Foram utilizadas seis dispersões de NPs de sílica, puras (Sílica-1-25, Sílica -2, Sílica-3-80, Sílica-4-130, Sílica-5^f NPs) ou peguiladas (revestidas por polietilenoglicol- Sílica-6 + PEG^f NPs) e 4 de óxido de ferro revestidas por sílica (FexOy@SiO2-1, FexOy@SiO2-2^f, FexOy@SiO2-3^f, FexOy@SiO2-4^f NPs). O processo de caracterização físico-química se deu por TEM e SEM para a identificação do tamanho primário da partícula, DLS para avaliação do potencial hidrodinâmico e medição

do potencial zeta por um *Zetasizer Nano* (Tabela 7). Os autores também avaliaram o pH das amostras.

O artigo #8 buscou verificar a confiabilidade dos seguintes métodos de detecção de endotoxinas para NPs: Teste de endotoxina bacteriana na versão gel, dois tipos de teste de endotoxina bacteriana cromogênicos (teste de endotoxina bacteriana cromogênico e endosafe-*Portable Test System*), um método baseado no uso de células repórter que contêm o receptor TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) e o método de extração de endotoxinas para NPs descrito na norma ISO 29701:2010. Utilizou-se TiO₂NPs, AgNPs e NPs de carbonato de cálcio (CaCO₃NPs), adquiridos em pó, e NPs de SiO₂ (SiO₂NPs) em suspensão, nas concentrações de 12,5 µg/ml, 50 µg/ml e 200 µg/ml. As NPs foram caracterizadas por TEM e SEM para avaliação da distribuição de tamanho e morfologia, por DLS para o tamanho hidrodinâmico.

A Tabela 7 resume os dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos artigos encontrados na presente revisão.

Tabela 7 - Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (início)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/ concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#1	(FeNPs)	99,5% (traços de metal e oxigênio <3%)	Pó negro	HSEM: 25 mg	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: TEM–tamanho médio: 35 a 45 nm (Sigma-Aldrich)
	(Al ₂ O ₃ NPs)	NI*	Suspensão em água (20%)	HSEM: 50 µL	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: TEM–distribuição do tamanho médio: 30-60 nm (Sigma-Aldrich)

Tabela 7 - Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/ concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#1	(AgNPs)	99,5%	Pó cinza escuro com PVP como dispersante (traços de metal)	HSEM: 25 mg	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: TEM - distribuição do tamanho médio: < 100 nm (Sigma-Aldrich)
	(TiO ₂ NPs)	NI*	Pó (caráter hidrofílico - agregados de partículas primárias)	HSEM: 25 mg	-Sem Recobrimento Informado pelo fornecedor (OECD): TEM- tamanho médio: Partículas primárias de ~20 nm (P-25/Aeroxide ^(R)). -Avaliação dos agregados: Agregados de várias centenas de nm em tamanho. (Indústria Evonik)
#2	poliestireno NPs	NI*	Contas de Latéx (<i>látex beads</i>), dispersas em PBS**	-MTT: entre 1 e 1.000 µg/ml - HSEMS: entre 1 e 1.000 µg/ml -Draize: 0,5 ml na concentração de 1.000 µg/ml	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: -TEM- tamanho médio: 50 nm (Sigma – Aldrich)
	TiO ₂ NPs	NI*	Pó, disperso em PBS**	-MTT: entre 25 e 1.000 µg/ml -HSEMS: entre 1 e 100 µg/ml - Draize: 0,5 ml na concentração de 100 µg/ml	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: -TEM- distribuição de tamanho médio < 25 nm (Sigma – Aldrich)

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/ concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#3	AgNPs- contendo polivinilpirrolidona, PVP, como dispersante	NI*	Suspensão em água deionizada	-BALB/c 3T3 e demais ensaios <i>in vitro</i> : concentração final- 0,67 a 10,0 µg/ml <i>In vivo</i> (injeção transtimpânica), vol.: 40µl -200 µg/ml -2.000 µg/ml - 4.000 µg/ml	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: -SEM: morfologia- partículas esféricas; tamanho médio= 100 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= 117 ± 24 nm; potencial zeta= -20 ± 9 mV (Colorobbia, Firenze, Itália)
#4	AuNPs	NI*	Suspensão aquosa	-Concentração final: 0,03 a 6 µg/ml	-Recobrimento por Citrato Análises realizadas pelos autores: -BET: área superficial- não informado -TEM: tamanho= 13 ± 1 nm; forma esférica DLS: tamanho hidrodinâmico= 18 ± 2 nm; potencial zeta=60,7 mV (Inmetro)
	AgNPs	NI*	Suspensão aquosa	-Concentração final: 0,67 a 10 µg/ml	-Recobrimento por PVP Análises realizadas pelos autores: -BET: área superficial- ND** -TEM: tamanho 20 ± 7 nm; forma, amorfo e polidisperso -DLS: tamanho hidrodinâmico= 20 a 116 ± 7 nm; potencial zeta=17,1 mV (Colorobia)

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/ concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#4	MSNP1	NI*	Pó	-Concentração final: 4,7 a 1000 µg/ml	-Sem recobrimento Análises realizadas pelos autores: -BET: área superficial = 910 ± 42 m ² /g -TEM; tamanho= 212 ± 52 nm; forma esférica e mesoporosa - DLS: tamanho hidrodinâmico=600 ± 115 nm; potencial zeta= - 35,7 mV (Nanológica)
	MSNP2	NI*	Pó	-Concentração final: 4,7 a 1000 µg/ml	-Sem recobrimento Análises realizadas pelos autores: -BET: área superficial- não declarado -TEM (tamanho, forma); 239 ± 50 nm, esférica e mesoporosa -DLS: tamanho hidrodinâmico= 462 nm; potencial zeta= -43,6 mV (Nanológica)
	MWCNT	NI*	Pó	-WST-1: Concentração final:20,2 a 300 µg/ml - BALB/c3T3N RU: 0,45 a 31,48 µg/ml	-Sem recobrimento Análises realizadas pelos autores: -BET: área superficial= 265 ± 18 m ² /g -TEM: tamanho= 10 ±1; forma tubular, comprimento >1000 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= NA – não aplicável; PZ+ 56,2 mV (Nanocyl)
#5	AuNPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	NI*	-Recobrimento por citrato DLS: tamanho hidrodinâmico=34,4 ± 0,3 nm; potencial zeta 30,2 ± 2,2 mV

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/ concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#5	PMLA NP	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	NI*	-Sem Recobrimento DLS: tamanho hidrodinâmico=11,7 ± 0,2 nm; potencial zeta= -22,7 ± 1,1 mV
	PMLA-PEG NP	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-RPT- 1,5mg/kg em 10 ml.	Sem Recobrimento DLS: tamanho hidrodinâmico=18,8 ± 6,1 nm.; potencial zeta=-6,3 ± 0,6 mV.)
	Dendrímeros de PAMAM	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	NI*	-Sem Recobrimento -DLS: tamanho hidrodinâmico= 7,0 ± 0,2 nm; potencial zeta=-36,6 ± 2,2 mV
#6	cloridrato de irinotecano e DSPE- <i>mPEG</i> ₂₀₀₀ NPs	NI*	Pó, disperso em água livre de endotoxinas	-Concentração final: 0,125 mg/ml -RPT1: 2,8 mg/ml na dosagem de 10 ml/kg; -RPT2: 11 mg/ml em um volume reduzido, de 1 ml/kg	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: TEM: tamanho médio ~ 10 nm DLS: tamanho hidrodinâmico monodisperso = 15,1 ± 0,8 nm; potencial zeta=-4,6 ± 1,3 mV

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#7	Sílica-3-80 NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por PEG Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula= 80 ± 5 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= 84,2 ± 6,7 nm; potencial zeta=-42,3 mV. (Hartlen)
	Sílica-4-130 NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por PEG Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula=128,3 ± 11,0 nm - DLS: tamanho hidrodinâmico=141,4 ± 15 nm; potencial zeta=-40,5 mV (Hartlen)
	Sílica-5 ^f NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por PEG Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula= 113 ± 14 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= 104,0 ± 35 nm; potencial zeta=-43,2 mV

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#7	Sílica-6 + PEG ^f NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por PEG Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM; tamanho primário da partícula=113 ± 14 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= 96,0 ± 34 nm; potencial zeta=-41,2 mV (Stober)
	FexOy@SiO ₂ -1NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por SiO ₂ Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula= 3-5 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= 16,6 ± 5,0 nm; potencial zeta=-44,7 Mv (Stober)
	FexOy@SiO ₂ -2 ^f NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por SiO ₂ Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula= 3-5 nm DLS: tamanho hidrodinâmico= 22,1 ± 6,6 nm; potencial zeta=-42,9 mV (Stober)

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (continuação)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#7	FexOy@SiO ₂ -3 ^f NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por SiO ₂ Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula= 3 - 5 nm DLS: tamanho hidrodinâmico= 88,9 ± 49 nm; potencial zeta= -43,2 mV (Stober)
	FexOy@SiO ₂ -4 ^f NPs	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por SiO ₂ Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM tamanho primário da partícula=75 nm -DLS: tamanho hidrodinâmico= 71,1 ± 10 nm; potencial zeta=-41,4 mV (Stober)
	Endorem	NI*	Dispersão em água livre de endotoxinas	-62,5 µg/ml (MDV) -125 µg/ml -250 µg/ml -500 µg/ml -1000 µg/ml	-Recobrimento por SiO ₂ Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: tamanho primário da partícula= 5 nm DLS: tamanho hidrodinâmico= 246 nm; potencial zeta=-35 mV

Tabela 7- Dados informados sobre a caracterização e administração das NPs nos trabalhos objeto de estudo (conclusão)

Número do Artigo	NPs estudadas	Grau de pureza	Forma física administrada	Doses/ concentrações utilizadas	Técnica(s) de caracterização das NPs/Atributos das NPs/Fonte do material
#8	TiO ₂ NPs	NI*	Suspensão em água livre de endotoxinas	-12,5 µg/ml -50 µg/ml -200 µg/ml	Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: distribuição de tamanho médio=15 ± 4 nm. e forma quase esférica. -DLS: tamanho hidrodinâmico= 396 nm.; potencial zeta=25 ± 1 mV.
	AgNPs	NI*	Suspensão em água livre de endotoxinas	-12,5 µg/ml -50 µg/ml -200 µg/ml	Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: distribuição de tamanho médio=25 a 80 - 90 nm.; formas esféricas e bastão); -DLS: tamanho hidrodinâmico= 90 nm; potencial zeta=42 ± 0,8.
	CaCO ₃ NPs	NI*	Suspensão em água livre de endotoxinas	-12,5 µg/ml -50 µg/ml -200 µg/ml	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: distribuição de tamanho médio= 67 e 582 nm; forma: mista, flocos. -DLS: tamanho hidrodinâmico= 90 nm; potencial zeta=-40 ± 1,1 mV
	SiO ₂ NPs	NI*	Suspensão em água livre de endotoxinas	-12,5 µg/ml -50 µg/ml -200 µg/ml	-Sem Recobrimento Análises realizadas pelos autores: -TEM/SEM: distribuição de tamanho médio= 19 ± 4 nm; forma esférica. -DLS: tamanho hidrodinâmico= 192 nm; potencial zeta=-40 ± 1,1 mV

NI* – Não informado

PBS ** solução salina tamponada com fosfato (do inglês, phosphate buffred saline).

Fonte: A autora, 2019.

4.2.2 GI da OECD nº 431– Avaliação de corrosão dérmica

O artigo #1 avaliou a possibilidade de corrosão dérmica por FeNPs (35 a 45 nm), AgNPs (<100nm) e Al₂O₃NPs (30-60 nm), usando a GI OECD nº 431. Os atributos de caracterização

aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1. Todas as NPs foram administradas nos tecidos da mesma forma que foram adquiridas, com exceção das Al₂O₃NPs, que foram diluídas de acordo com a orientação do fabricante para ser administrada.

Das NPs em pó, 25 mg, conforme orientação da GI, foram administradas sobre o modelo cutâneo. Observou-se leve agregação quando as NPs foram colocadas em contato com a superfície da pele. Para as Al₂O₃NPs o volume aplicado foi de 50 µL (conforme orientação da GI). Como controle positivo da GI OECD n° 431, utilizou-se o KOH e como controle negativo, o PBS. Para caracterizar a negatividade do ensaio no modelo RHE EpiDermTM, a viabilidade celular deve ser maior ou igual a ≥ 50% no teste de 3 minutos e maior ou igual a 15% no teste de 60 minutos. Três réplicas de EpiDermTM foram usadas para cada experimento. Os resultados indicaram a ausência do potencial para corrosão dérmica.

Buscando parâmetros de comparação com o resultado do teste no modelo RHE, os autores fizeram comparações histopatológicas e dosaram a citocina IL-1α no tecido. Usaram dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodiumdodecyl sulfate*-SDS) e PBS como controles positivo e negativo, respectivamente. Não foram observadas alterações significativas em nenhum dos testes comparativos. Nas condições experimentais descritas, todas as NPs testadas foram consideradas não irritantes e não corrosivas.

Em 2018, a OECD publicou o documento: “*Evaluation of in vitro methods for human hazard assessment applied in the OECD testing programme for the safety of manufactured nanomaterials*”. O estudo faz um levantamento dos trabalhos realizados dentro dos programas da agência, que testaram as próprias normas já em vigor para substâncias químicas em nanoescala, no programa de nome: “*Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials*” (Programa de Testes de Nanomateriais Manufaturados), terminado em 2013. O programa incluiu também estudos reportados ou de literatura que tivessem utilizado as normas da OECD para testar NPs, bem como os que tivessem utilizado outras metodologias, justamente para levantar os novos estudos. Dois trabalhos de corrosão cutânea, que foram conduzidos pelo programa de testes de materiais manufaturados da OECD, foram mencionados no referido documento (OECD, 2018). Um deles estudou MWCNNPs e o outro, ZnNPs cobertas com *triethoxycaprylylsilane*. O primeiro não foi discutido porque os detalhes não foram reportados. O segundo usou a GI n° 431 e o EpiDermTM e as NPs foram classificadas como não corrosivas. No entanto, este segundo estudo está descrito tão superficialmente que nem sequer a concentração utilizada foi mencionada na referida publicação da OECD. A lista

de referências dos estudos que fizeram parte do programa da OECD não foi mencionada, de forma que não foi possível acessar o conteúdo original.

O documento da OECD (OECD, 2018) abordou um único estudo levantado da literatura sobre corrosão cutânea, de Choi *et al.* (2014), citado dentre os estudos de pele que utilizaram metodologias da OECD. No entanto, o trabalho usou o modelo RHE *Keraskin*[®], que não faz parte dos kits comerciais recomendados pela GI (portanto, não atendeu aos critérios de inclusão do presente estudo), embora seja um modelo validado. Foram testadas ZnNPs e TiO₂NPs e sua mistura, presente em protetores solares, utilizando a metodologia GI OECD n° 431. A concentração utilizada no modelo RHE foi de 25% em água deionizada de cada NP para um total de 30 µl de suspensão adicionado ao modelo cutâneo. Já para as misturas utilizou-se um volume de 50% de ZnNPs e 50% de TiO₂, para finalmente produzir um total de 30 µl de suspensão. Nos animais, os autores descrevem a utilização de 0,5g de cada NP e da mistura uniformemente espalhadas num pano aplicado à 6 cm² de pele e coberto por gaze com curativo anti-alérgico, em coelhos pesando cerca de 3 kg. Choi *et al.* (2014) comparou os resultados com dosagens de IL1- α , avaliações histopatológicas (como no artigo #1) e com testes *in vivo*. Nos resultados, nem as NPs e nem as misturas se mostraram corrosivas no teste *Keraskin*[®], o que foi confirmado pelos demais testes. O documento da OECD conclui sobre o artigo de Choi *et al.* (2014) afirmando que o estudo aponta para a provável aplicabilidade da GI n° 431 na avaliação do potencial corrosivo de NPs e misturas. Vale ressaltar que os resultados do artigo #1 para a metodologia testada estão de acordo com os resultados encontrados por Choi *et al.* (2014).

4.2.3 GI da OECD n° 439– Avaliação de irritação cutânea

O artigo #1 também avaliou a possibilidade de indução de irritação cutânea por FeNPs, Al₂O₃NPs, TiO₂NPs e AgNPs usando a GI OECD n° 439 a partir do kit comercial de HSEM, EpiDermTM, recomendado nas GIs. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1. Todas as NPs foram administradas nos tecidos da mesma forma que foram adquiridas, com exceção das Al₂O₃NPs, que foram diluídas de acordo com a orientação do fabricante antes de serem administradas. Das NPs em pó, 25 mg, conforme orientação da GI, foram administradas sobre o modelo cutâneo. Observou-se leve agregação quando as NPs foram colocadas em contato com a superfície da pele. Para as Al₂O₃NPs, o volume aplicado foi de 50 µL (conforme orientação da GI). Como controle positivo utilizou-se SDS e como negativo, PBS. O ensaio da GI OECD n° 439 (irritação

cutânea) consiste num teste, cuja avaliação é realizada após 60 minutos da aplicação da substância e o resultado se configura negativo quando a viabilidade celular for maior que 50%. Três réplicas de EpiDermTM foram usadas para cada experimento. À fim de verificar a possibilidade de danos teciduais ou indícios de processos inflamatórios no modelo RHE, os autores fizeram comparações histopatológicas e dosaram a citocina IL-1 α no tecido. Usaram SDS e PBS como controles positivo e negativo, respectivamente. Não foram observadas alterações significativas em nenhum dos testes comparativos. Conclui-se, portanto, que nas condições experimentais descritas no artigo #1, os resultados indicam ausência de potencial de irritação cutânea para as NPs em questão.

O artigo #2 avaliou NPs de poliestireno (tamanho médio 50 nm) e TiO₂NPs (tamanho médio < 25 nm) no mesmo modelo de HSEM para irritação cutânea usado no artigo #1, o kit comercial EpiDermTM. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1. Os autores demonstram preocupação com a obtenção de uma solução estável e menos agregada possível e utilizam a sonicação e o vórtex imediatamente antes da preparação das diluições e da administração nos tecidos HSEMs, animais ou células, para evitar o efeito indesejado.

Não foi mencionado o uso de nenhuma GI da OECD, no entanto, os autores afirmaram utilizar o protocolo do fabricante, que está de acordo com a GI OECD nº 439 (MATTEK, 2019). Várias concentrações foram utilizadas; entre 1 e 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de poliestireno e 1 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de TiO₂NPs, diluídos em PBS. O controle positivo utilizado foi 5% SDS e o negativo, PBS. Este resultado fora comparado ao teste de Draize, no qual se utilizou a dosagem de 0,5 ml de solução na concentração de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de NPs de poliestireno e 100 $\mu\text{g/ml}$ de TiO₂NPs, usando PBS como veículo. O modelo HSEMS não apresentou queda de viabilidade celular para nenhuma das duas NPs testadas, indicando o resultado negativo para irritação cutânea. No teste *in vivo* de Draize, em nenhum animal, mesmo após exposição por 24 horas e 72 horas, se observou eritema, edema ou abrasões, indicando que não houve processo de irritação cutânea induzido pelas NPs em estudo, de acordo portanto com os resultados obtidos nas HSEMS. O estudo incluiu também um ensaio MTT de citotoxicidade em queratinócitos (HaCat), no qual o poliestireno foi testado nas concentrações entre 1-100 $\mu\text{g/ml}$ e o TiO₂, entre 25-1.000 $\mu\text{g/ml}$. A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48 horas e no teste com NPs de poliestireno houve queda notável da viabilidade celular partir da concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$, por 24 ou 48h, enquanto não se observou diferenças para TiO₂NPs. Os resultados no modelo HSEM foram concordantes com o teste *in vivo* de Draize.

O estudo de Choi *et al.* (2014), mencionado anteriormente no item 4.2.1, teve apenas o experimento de corrosão dérmica citado no documento da OECD (OECD, 2018), embora tenha realizado estudo que abordava também a irritação cutânea. O estudo de irritação cutânea usou o modelo RHE *Keraskin*[®], que não faz parte dos kits comerciais recomendados pela GI, embora seja um modelo validado. Foram testadas em ZnNPs e TiO₂NPs e sua mistura, presente em protetores solares, utilizando a metodologia GI OECD n° 439. A concentração utilizada no modelo RHE foi de 25% em água deionizada de cada NP para um total de 30 µl de suspensão adicionado ao modelo cutâneo. Já para as misturas utilizou-se um volume de 50% de ZnNPs e 50% de TiO₂NPs, para finalmente produzir um total de 30 µl de suspensão, enquanto nos animais utilizou-se 0,5g. Choi *et al.* (2014) comparou os resultados com dosagens de IL1- α , avaliações histopatológicas e aos testes *in vivo*. Nos resultados, nem as NPs e nem as misturas se mostraram irritantes no teste *Keraskin*[®], o que foi confirmado pelos demais testes. Os resultados do artigo #2 estão de acordo com os resultados encontrados por Choi *et al.* (2014).

Park *et al.* (2010) e Chen *et al.* (2019) realizaram experimentos semelhantes ao artigo #2, avaliando a toxicidade dérmica de NPs em modelos, 2D, 3D e *in vivo*. O primeiro testou dois tamanhos de NPs de sílica nas concentrações de 0-300 µg/ml nas HaCaT e 500 µg/ml tanto no modelo EpiDermTM quanto nos coelhos. O segundo usou Ag nas concentrações de 0,035; 0,07; 0,14; 0,28 e 0,56ng por célula, proporcionalmente para cada ensaio. Os resultados observados convergem com o observado no artigo #2. Lehmann *et al.* (2018) testaram 2 tipos de nanofios de prata na concentração de 0,6 mg/mL no modelo RHE epiCS (recomendado na GI OECD n° 439), em queratinócitos humanos primários humanos (obtidos por meio da doação de tecido cutâneo de pacientes que se submeteram a cirurgias plásticas, com seu consentimento) e no MTT. O resultado dos experimentos nos tecidos classifica as AgNPs como não irritantes, nos dois casos, embora o teste de citotoxicidade tenha apontado citotoxicidade moderada. A diferença dos resultados de citotoxicidade (2D) em relação ao teste no tecido (3D) é justificada por estes autores pela eficiência da barreira cutânea, bem como concluiu Chen *et al.* (2019.) A cultura 3D permite que as células resistam melhor ao estresse, mimetizando suas propriedades *in vivo*. Dessa forma, é recomendável trabalhar com as culturas 3D para triagens terapêuticas (BIRGERSDOTTER *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006).

Por conta da semelhança no modelo cutâneo utilizado nos artigos #1 (corrosão dérmica) e #2 (irritação cutânea) e algumas estratégias de comparação em comum, cabe uma análise conjunta. Os tecidos RHE usados pelos artigos #1 (corrosão dérmica) e #2 (irritação cutânea), mimetizaram de forma tridimensional a estrutura estratificada e funcional da camada epidérmica, incluindo o estrato córneo (HAYDEN *et al.*, 2015). A histologia, enquanto estudo

dos tecidos, permite identificar possíveis alterações/lesões tissulares (AIRES *et al.*, 2011) que possam ter ocorrido após o contato com as NPs. As ILs são mediadores inflamatórios que são liberados quando há lesão celular ou perturbação na membrana (DINARELLO, 1998). Por isso, a detecção de IL-1 α no estrato córneo pode ser utilizada como um indicador de inflamação cutânea (PERKINS *et al.*, 2002). Já a avaliação *in vivo* em animais é o método científico tradicional (HARTUNG *et al.*, 2001). Os resultados dos modelos RHE se mostraram convergentes com os demais, com exceção da comparação com modelos cutâneos 2D, realizada pelo artigo #2, para avaliação de irritação cutânea. Estudos da literatura mostram que, por conta dos complexos eventos que ocorrem em culturas 3D, muitas propriedades biológicas são perdidas nas avaliações realizadas em 2D. Por isso, é comum que os resultados em culturas 2D sejam insatisfatórios em relação ao que se observa *in vivo* (BIRGERSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005).

A literatura demonstrou resultados concordantes inclusive entre modelos 3D, o teste HET-CAM (*Hen Egg Chorion Allantoic Membrane* – Membrana córioalantóide de ovos de galinha) e o teste *in vivo*. Kishore, Surekha e Murthy (2009) testaram 10 mg de dois tipos de MWCNT (Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla, do inglês, *Multiwalled Carbon Nanotubes*) no *Episkin*TM (recomendado na GI da OECD) e 0,3 mg nos ovos embrionados, enquanto os animais (pesando entre 2 e 3 kg) foram tratados com 0,5g. A aplicação das NPs *in vivo* foi realizada após sua umidificação com uma quantidade mínima de água destilada para preparar uma pasta, que foi aplicada a uma área de 6m² de pele e posteriormente coberta com gaze. Todos os resultados foram convergentes e apontaram para o potencial não irritante das NPs.

4.2.4 GI da OECD nº 432– Avaliação de fototoxicidade

No artigo#2, avaliou-se o potencial de fototoxicidade de NPs de poliestireno (tamanho médio 50 nm) e TiO₂NPs (tamanho médio < 25 nm), conforme descrito na GI OECD nº 432. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

Os autores comparam três ensaios: o ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU - conforme descrito na GI OECD nº 432 - o modelo HSEM EpiDermTM e o teste *in vivo* em cobaias. No teste em animais, cinco fêmeas por grupo tiveram as soluções de NPs administradas na pele, com o volume de 0,5 ml de NPs de poliestireno (1.000 μ g/ml) e TiO₂NPs (100 μ g/ml) diluídos em PBS. Parte da área onde as NPs foram aplicadas foi coberta e a outra parte deixada exposta

a 10 J/cm^2 de luz ultravioleta A (UVA). Os autores demonstram preocupação com a obtenção de uma solução estável e menos agregada possível e utilizam a sonicação e o vórtex imediatamente antes da preparação das diluições e da administração nos tecidos HSEMs, animais ou células, para evitar o efeito indesejado. Nos modelos de pele, utilizaram-se as mesmas concentrações das cobaias (e no 3T3NRU, várias concentrações entre 1 e $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ para cada NPs. Parte dos tecidos foram expostos à 6 J/cm^2 de luz UVA e outra parte foi mantida no escuro (controle). O resultado no modelo HSEM mostrou que não houve queda de viabilidade celular em comparação ao tecido cutâneo não exposto à UVA, indicando ausência de potencial fototóxico. No teste de citotoxicidade, os valores de PIF e MPE do 3T3 NRU indicaram ausência de fototoxicidade para ambas as NPs. No teste *in vivo* não se observou eritema, edema ou abrasões em relação ao grupo não exposto à luz UVA, confirmando a ausência de potencial fototóxico indicada pelo teste EpiDermTM. Logo, os resultados obtidos indicam a concordância dos testes. Como o objetivo era avaliar a aplicabilidade dos modelos HSEM, os autores do artigo #2 concluíram que esse modelo pode ser útil na avaliação de fototoxicidade de NPs.

Choi *et al.* (2011) conduziram outro estudo semelhante ao do artigo #2, em nanosílicas, SiO_2NPs , para a avaliação de fototoxicidade. Foram utilizadas concentrações entre 25-500 $\mu\text{g/ml}$ no 3T3 NRU (conduzido conforme a GI nº 432), $1.000 \text{ }\mu\text{g/ml}$ no modelo EpiDermTM e 500 $\mu\text{g/ml}$ no modelo animal. Embora se tenha observado queda de viabilidade celular concentração-dependente, o cálculo de PIF e MPE revelaram ausência de fototoxicidade. Nenhum dos testes *in vitro* apresentou diferença de viabilidade antes e após a exposição à radiação. Os resultados foram compatíveis com os obtidos *in vivo*. Embora não seja objeto deste estudo, vale mencionar que tanto os autores do artigo #2, como Choi *et al.* (2011), consideraram o modelo HSEM promissor para a avaliação de fototoxicidade por seus resultados se mostrarem concordantes como os demais testes.

4.2.5 GI da OECD nº442-B – Avaliação de sensibilização cutânea

No artigo #2, avaliou-se o potencial de sensibilização cutânea de poliestireno NPs (tamanho médio 50 nm) e TiO_2NPs (tamanho médio $< 25 \text{ nm}$), por meio do ensaio LLNA: BrdU-ELISA, descrito na GI OECD 442B. Os mesmos autores realizam também a avaliação de sensibilização cutânea pelo LLNA (com o BrdU incorporado), teste *in vivo* descrito no OECD nº 442-B. O experimento utilizou quatro grupos de animais contendo quatro fêmeas em cada um. Aplicou-se, topicamente, no dorso das orelhas dos animais, $25 \text{ }\mu\text{l}$ de volume nas

concentrações de 10, 100 e 1.000 µg/ml (veículo PBS) para cada NP. Utilizou-se eugenol como controle positivo e o PBS como controle negativo. Os valores de SI verificados indicaram que não houve sensibilização cutânea induzida pelas NPs estudadas. Os autores concluem que este pode ser um método útil na avaliação de sensibilidade cutânea de NPs. Como limitação do trabalho, mencionam a ausência de tratamentos que garantissem a esterilização das NPs, pois os processos poderiam causar alterações físico-químicas. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

O levantamento constante do documento da OECD (OECD, 2018) não abordou nenhum trabalho que avaliasse a sensibilização cutânea. Choi *et al* (2011), conduziram outro estudo semelhante ao do artigo #2, avaliando sensibilização cutânea em nanosílicas, (SiO₂NPs), também por meio da GI OECD 442B. Utilizou-se 4 grupos de cobaias, formados aleatoriamente. 25µg de volume da concentração variando entre 10 e 1000 µg/ml de SiO₂NPs foram administradas diariamente no dorso de ambas as orelhas dos animais por 3 dias consecutivos. Os animais não foram tratados o dia 4. No dia 5 administrou-se uma única injeção intraperitoneal de BrdU (5mg/rato/injeção). No dia 6, os linfonodos dos animais foram removidos, pesados e armazenados a -20C° até a medição usando o ensaio ELISA. O SI abaixo de dois, obtido nos resultados, indicaram ausência de potencial para sensibilização cutânea. O autor conclui que o ensaio LLNA: BrdU-ELISA pode ser útil na avaliação do potencial de sensibilização cutânea de NPs, assim como os autores do artigo #2. Para Dobrovolskaia, Germolec e Weaver (2009), embora o ensaio LNNA padrão venha sendo utilizado para avaliar o potencial de sensibilização de pequenas moléculas, este não é um ensaio adequado para NPs. Segundo os autores, a maior limitação está no fato de que no LLNA, a substância é aplicada no dorso da orelha dos animais, enquanto a maior parte das NPs se mostra incapaz de penetrar na barreira cutânea. Por isso, os autores sugerem que a forma mais adequada de avaliação, seria um ensaio que é uma variação do LLNA, o *Lymph Node Proliferation Assay* - LNPA (o ensaio de proliferação no linfonodo local). O LNPA vem sendo utilizado para prever imunotoxicidade de fármacos em humanos (WEAVER *et al.*, 2005). O protocolo é idêntico ao do LNNA, exceto pela via de administração da substância, que é administrada por via subcutânea, em vez da administração tópica na pele. Para Dobrovolskaia, Germolec e Weaver (2009), esta via de administração seria a mais indicada para NPs, uma vez que a maior parte das nanopartículas não penetra na pele íntegra. Outros estudos, de fato, apontam a não penetração ou baixa penetração das NPs testadas na barreira dérmica (CROSERÁ; PRODI; MAURO, 2015; XIE; LU; LU, 2015; MOHAMED *et al.*, 2019). No entanto, já se sabe que a toxicidade das NPs depende tanto de suas características físico-químicas, quanto da dose

administrada e da via de administração/exposição (YILDIRIMER, *et al.*, 2011). Tendo em vista que o LLNA é um teste de sensibilização cutânea e que a alteração da via de administração das NPs pode gerar alteração nos efeitos biológicos, entendemos o posicionamento de Choi *et al.* (2011), o mesmo do artigo #2, indicando o LLNA: BrdU-ELISA como mais indicado para avaliação de sensibilização cutânea de NPs.

Outra questão importante que envolve tanto o ensaio LLNA: BrdU-ELISA quanto o LNPA é o uso de espectrofotometria para a quantificação do BrdU nos DNAs linfocíticos (OECD, 2018; BRUNO, 2014). Considerando que a possibilidade de interferência das NPs com procedimentos de leitura óptica, pela formação de agregados/aglomerados ou pela densidade óptica da NP já foi constatada (OOSTINGH *et al.*, 2011), mais estudos serão necessários para adequar a aplicabilidade do teste, possivelmente, de acordo com o tipo de NPs.

4.2.6 GI da OECD nº 129– Avaliação de toxicidade aguda

O artigo #3 avaliou o potencial de toxicidade de AgNPs (tamanho médio= 100 nm) e AgNO₃NPs (tamanho médio= 100 nm) no ouvido externo, médio e interno de ratos, utilizando a 3T3 NRU –GI OECD nº 129, que estima a dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica. Os resultados são comparados com os obtidos em ensaios de citotoxicidade. O experimento *in vivo*, embora não seja objeto do nosso estudo, será mencionado já que seus resultados foram utilizados de forma comparativa com os ensaios *in vitro* e permitiram a conclusão dos autores. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

Os autores informaram a estabilidade das AgNPs em perilinfa artificial, uma vez que a perilinfa seria o principal fluido com o qual as NPs teriam contato após sua administração.

No ensaio *in vivo* desenvolvido pelo artigo #3, soluções de 200, 2.000 e 4.000 µg/ml de cada NPs estudada foram injetadas por via transtimpânica em 14 ratos machos. As imagens de ressonância magnética mostraram que cinco horas após a injeção transtimpânica de AgNPs nas concentrações entre 200 µg/ml e 4.000µg/ ml, houve alteração da permeabilidade das barreiras biológicas do pavilhão auditivo externo, ouvido médio e interno, sendo possível identificar o processo de apoptose e de fragmentação de DNA. 200 µg/ml de Ag NPs induziram alterações reversíveis na barreira biológica e nas funções auditivas (aferidas pela avaliação do potencial auditivo do tronco cerebral). A perda auditiva foi constatada para a dose de 4.000 µg/ml, com recuperação parcial, exceto para o vestíbulo, que não apresentou recuperação total após sete dias para dosagens abaixo de 4.000 µg/ml.

Dentre os testes de citotoxicidade realizados pelo artigo #3, está o 3T3 NRU –GI OECD nº 129, que estima a dose inicial para teste de toxicidade oral aguda sistêmica. Além deste, os autores executaram ainda, usando a mesma linhagem celular (Balb/c3T3): o ensaio enzimático de oxi-redutase dependente de NAD (P)H celular (do inglês, *NAD (P)H dependente celular oxireductase enzymes assay*- WST-1) e a dosagem de ATP celular total e coloração de iodeto de propídio. O WST-1 avalia a função mitocondrial, o ATP celular total dosa o ATP como indicador da função mitocondrial e a coloração com o iodeto de propídio avalia a integridade da membrana nuclear. Os estudos *in vitro* envolveram oito concentrações diferentes, sendo a final 0,67-10,0 µg/ml. O meio celular contendo 10% de água deionizada foi usada como controle do veículo. Cada ensaio foi repetido duas vezes. Os resultados para os dois tipos de AgNPs testadas mostraram que o IC₅₀ encontrado nos ensaios *in vitro* resultaram em valores entre 2,2 e 3 µg/ml.

Considerando os IC₅₀ encontrados nos testes *in vitro*, os autores do artigo #3 concluíram que as células *in vitro* são muito mais sensíveis do que apontam os estudos *in vivo*. Neste estudo, a sensibilidade identificada *in vitro* em relação a *in vivo*, foi maior que 1.000 vezes. Segundo eles, essa diferença se justifica pelas funções protetivas executadas pelas camadas de barreiras biológicas.

O artigo #4 testou a aplicabilidade de métodos, tradicionalmente, usados para produtos químicos para a avaliação de toxicidade de NPs em diferentes tipos celulares de mamíferos. Utilizou-se AuNPs (13 ± 1 nm), AgNPs (20 ± 7 nm), MWCN (tamanho= 10 ± 1 nm) e dois tipos de NPs de sílica mesoporosa (do inglês, *mesoporous sílica nanoparticles*-MSNP) (MSNP1= 212 ± 52 nm e MSNP2= 239 ± 50 nm) em fibroblastos Balb/c 3T3, usando o ensaio 3T3 NRU –GI OECD nº 129, que estima a dose inicial para teste de toxicidade oral aguda sistêmica. Paralelamente, as mesmas NPs foram testadas em fibroblastos Balb/c 3T3, em macrófagos alveolares de ratos NR8383 e monócitos humanos U937 usando o ensaio WTS-1. O 3T3 NRU não foi testado com macrófagos e monócitos por ser aplicável apenas para culturas celulares aderentes; já o WST-1 pode ser usado em culturas aderentes ou em suspensão. A possibilidade de interferências relacionadas às endotoxinas foi prevenida preparando-se todas as suspensões em condições de esterilidade e realizando testes de esterilidade das suspensões utilizadas.

De acordo com os dados informados, os autores identificam que o tamanho das MSNPs 1 e 2 ultrapassam 100 nm, o que vai de encontro à definição das nanopartículas. No entanto, elas não foram excluídas do processo. MSNP1NPs, MSNP2NPs e MWCNT NPs foram fornecidos em pó, enquanto AgNPs e AuNPs, em suspensão aquosa. Os atributos de

caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

Buscando identificar possíveis interferências das NPs com os ensaios, os autores trabalharam com controles abióticos. Neles, coloca-se os reagentes do ensaio em contato com as NPs engenheiradas, sem as células, para observação. Foram feitos controles abióticos para cada concentração testada. Os controles não indicaram a ocorrência de interferências. Pelo mesmo motivo, os autores compararam as características físico-químicas (tamanho hidrodinâmico e potencial zeta) obtidas por DLS para cada NP testada em água deionizada e em cada meio de cultura a ser utilizado nos ensaios, logo, avaliaram a forma a ser administrada. As concentrações finais para as NPs utilizadas nos ensaios *in vitro* foram: 0,03-6 µg/ml de AuNPs, 0,67-10 µg/ml de AgNPs, 4,7-1000 µg/ml de MSNP1NPs e de MSNP2NPs, 20,2-300 µg/ml de MWCN no ensaio com Balb/c 3T3 NRU e 0,45-31,48 µg/ml MWCN no WTS-1. Os resultados da comparação da caracterização físico-química na água deionizada e nos diferentes meios de cultura mostram grande variação no tamanho das partículas, dependendo do meio. Por exemplo, o tamanho hidrodinâmico do MSPN2 decresceu 19,9 vezes no meio de cultura para células BALB/c 3T3, enquanto o decréscimo foi de apenas 2,2 no meio de cultura de monócitos humanos. As AgNPs decresceram 1,2 vezes em meio de cultura para células Balb/c 3T3, mas cresceram 13 vezes no meio de cultura de monócitos. Os autores publicaram a tabela completa com os valores encontrados, além de outra contendo as especificidades relativas à composição de cada meio utilizado. Antes das medições, utilizou-se o sonicador para dispersar melhor as NPs. Foram medidos também os valores de pH das soluções de NPs antes e depois da exposição ao meio de cultura celular e verificou-se que após o contato com o meio, os pHs se aproximaram da neutralidade.

Nos ensaios de citotoxicidade, oito concentrações diferentes foram testadas para cada ensaio. Utilizou-se o SDS como controle positivo e células não tratadas como controle negativo. Utilizou-se a sonicação buscando facilitar a dispersão das partículas. Cada ensaio foi executado duas vezes. Os resultados para AgNPs, mostraram redução da viabilidade celular dependente da dose em todos os tipos celulares, com IC₅₀ que variaram entre 3.1 e 9.8 µg/ml. Para MSNP1NPs, os resultados foram divergentes: Balb/c 3T3 NRU não apresentaram queda de viabilidade celular no teste com MSNP1NPs, mas Balb/c 3T3 no WST-1, apresentaram queda de viabilidade de 20%, sem relação dependente de concentração, para a mesma NPs. A mesma ocorrência foi identificada para o teste com MSNP1NPs no WST-1 realizado com células NR8383. Situação semelhante foi identificada para AuNPs: Balb/c 3T3 no NRU não apresentaram queda de viabilidade, mas, células NR8383 e U937 no WST-1, apresentaram

queda de viabilidade celular independente da dose. Esse resultado foi explicado pelos autores como alguma interferência no ensaio e não à citotoxicidade, justamente pela ausência da relação dose-dependente.

Os autores notaram que a homogeneidade necessária para a dispersão da NP fica, muitas vezes, comprometida. Ainda que a solução de NPs seja homogênea, a conformação das NPs pode ser alterada assim que a solução entra em contato com os meios de cultura celulares, resultando na formação de agregados ou na desagregação em vários tamanhos. Isso dificulta o entendimento de qual é a real forma/concentração no momento da exposição e essa limitação dos testes deve ser considerada. Portanto, o estudo conclui que os testes tradicionais de citotoxicidade podem ser utilizados para a avaliação de toxicidade de materiais engenheirados com cautela, assim como os IC₅₀ neles obtidos. Considerando que para uma investigação inicial não é necessário saber todos os detalhes de interação das NPs, a sugestão dos autores é de que os tradicionais testes de citotoxicidade sejam usados com protocolos padronizados como triagem.

Farcas *et al.* (2015) observaram a interferência de NPs com a leitura óptica, procedimento comum para a quantificação da viabilidade celular em diversos ensaios de citotoxicidade. O artigo #4 não relata queda de viabilidade celular independente da concentração no ensaio 3T3 NRU, no entanto, este fato é relatado para o ensaio WST-1, interpretado como interferência das NPs no ensaio, justamente pela falta da relação dose-efeito. Sabendo que a leitura de ambos os testes é também realizada por espectrofotometria (PROTOCOLO SIGMA-ALDRICH, 2020), e da possibilidade da interferência das NPs com ela (OOSTINGH *et al.*, 2011), é possível que seja esse o motivo da interferência constatada no artigo.

Os resultados da comparação da caracterização físico-química na água deionizada e nos diferentes meios de cultura, realizados no artigo #4, mostram grande variação no tamanho das partículas, dependendo do meio. Brown *et al.* (2007), também observaram que determinados meios de cultura e fatores a eles relacionados influenciam a agregação das NPs. O artigo #2 identificou agregação no momento do contato das NPs com a pele dos animais e mostrou preocupação com a obtenção de uma solução estável, com o uso de vórtex e sonicação. Mas, o artigo #4 comenta que o uso de estratégias desse tipo com esse objetivo, não refletem o que ocorre *in vivo*. Já se sabe que as proteínas, particularmente as do soro, influenciam a agregação de NPs (ALBANESE; CHAN, 2011). Assim, considera-se que a aglomeração seja um processo quase inevitável *in vivo*. Por isso, as consequências do processo de aglomeração na captação das NPs e em sua toxicidade precisam ser estudadas, *in vitro* e *in vivo*. Mas, isso não é simples,

já que, a avaliação por DLS por exemplo, pode ficar comprometida em meios celulares ou fluidos biológicos por conta da presença de proteínas (BRAECKMANS *et al.*, 2010).

O artigo #3 obteve IC₅₀ de AgNPs bem semelhantes nos quatro testes de citotoxicidade comparados (3T3 NRU, ATP, coloração com iodeto de propídio e WST-1). Da mesma forma, os resultados para IC₅₀ de AgNPs nos testes comparados no artigo #4 (3T3 NRU e WST-1), tiveram pequena variação. Entretanto, os resultados do artigo #4 mostraram resultados divergentes entre o 3T3 NRU e o WST-1, para o mesmo tipo celular e também para tipos celulares diferentes. Quedas de viabilidade celular independente de dose foram atribuídas a interferências não identificadas. Para Lewinski *et al.* (2008), controlar, adequadamente, o ambiente da cultura e escolher o teste de citotoxicidade adequado, de acordo com a NP, é fundamental para evitar a distorção dos resultados. A sugestão do artigo #4 é de que os tradicionais testes de citotoxicidade sejam usados com protocolos padronizados como triagem. Dessa forma, é possível o ranqueamento da toxicidade de NPs com um bom custo-benefício, e os esforços seriam direcionados para o aprofundamento das investigações apenas naquelas NPs que se mostrarem mais promissoras e menos tóxicas, o que está de acordo com a recomendação de Arora *et al.* (2012) e Nogueira *et al.* (2014), para testes *in vitro*. Farcas *et al.* (2015) recomenda, inclusive, o uso de múltiplos testes de citotoxicidade para a avaliação de NPs.

Um dos maiores desafios dos ensaios *in vitro*, segundo o Projeto “Predict-IV”, é a ausência de dados que permitam as extrapolações para o contexto *in vivo*, já que as concentrações aplicadas às células não podem ser diretamente comparadas a doses sistêmicas (HARTUNG; SABBIONI, 2011). A dificuldade dessa correlação está demonstrada na alta sensibilidade identificada *in vitro* em relação a *in vivo*, percebida no artigo #3. Assim, o teste 3T3 NRU, para avaliação de fototoxicidade, pode ser utilizado com cautela para estudos de triagem. Resultados distorcidos podem levar ao uso de mais animais que o realmente necessário para a determinação da dose oral inicial nos experimentos que avaliam toxicidade aguda sistêmica.

Em suma, identificou-se, neste estudo, a escassez de trabalhos com as metodologias da OECD para NPs. O próprio documento da OECD, “*Evaluation of in vitro methods for human hazard assessment applied in the OECD testing programme for the safety of manufactured nanomaterials*”, de 2018, menciona que as GIs não estão sendo, extensivamente, utilizadas e informa que muitos dos estudos reportados utilizam outras metodologias (OECD, 2018), o que explica o número limitado de resultados recuperados neste trabalho.

O documento aponta ainda, diversas inconsistências e omissões de informações identificadas nos estudos que usam as GIs da OECD aplicados à NPs, como: informações

relacionadas às dosagens/concentrações e unidades de medida usada nas dosagens, caracterização físico-química, a consideração de possíveis interferências das NPs com o ensaio e protocolos usados (preparação das amostras, tipos celulares utilizados, tempo de exposição, controles positivos e negativos utilizados, dentre outros). Assim, o estudo aponta como pontos críticos a serem resolvidos no que diz respeito ao uso de testes em NPs: a dose/concentração a ser testada (de modo que a dispersão desfavoreça a agregação), a área de superfície das NPs, o tempo de exposição e a compatibilidade do fluido receptor com as NPs. Terminam concluindo que as GIs mais utilizadas para NPs precisam ser revistas, de modo que possam ser aplicadas com parâmetros adequados às propriedades das NPs.

O informe menciona também a possibilidade de interferências causadas pelas NPs em ensaios que usam o MTT e comenta a importância de que as NPs sejam lavadas da cultura celular antes do ensaio do MTT ser iniciado, para evitar interferências. Alguns testes de citotoxicidade, como MTT vêm sendo bastante utilizados para a avaliação de nanotoxicidade (OECD, 2018), mas NPs podem interferir com a insolubilidade do formatazan MTT (ALMUTARY; SANDERSON, 2016). Já foi observada a interferência dependente da concentração das NPs na leitura óptica utilizada no MTT e em outros ensaios. Também foi demonstrado que ensaios que envolvem a dosagem de citocinas podem sofrer interferência em função da composição da NP e da pré-dispersão das partículas. TiO₂NPs de características idênticas, que diferiram apenas por terem sido adquiridas do fabricante na forma de pó e na forma dispersa, resultaram em dosagens adequadas para IL-8 no primeiro caso, no entanto, na forma dispersa ocorreu ligação entre as NPs e a IL-8, distorcendo o resultado (KROLL *et al.*, 2012).

As diferenças de comportamento das NPs em relação aos diferentes meios de cultura testados embasaram a recomendação do artigo #4, para a formalização de protocolos de ensaios de citotoxicidade. Esse posicionamento está alinhado com o da OECD (OECD, 2018). Já está em curso um estudo resultante da parceria da OECD com o comitê técnico ISO 229, sobre a aplicabilidade deste tipo de ensaio para NPs, bem como o desenvolvimento de um protocolo.

A Tabela 8 apresenta os principais dados extraídos dos testes das GIs da OECD avaliados.

Tabela 8 - Controles utilizados, testes paralelos e interferências identificadas nas guias da OECD identificadas nos resultados

Testes objeto de estudo	Controles	Testes paralelos no mesmo artigo	Interferências observadas
- GI OECD nº 439 (irritação cutânea) (artigo #1)	CP: KOH CN: PBS	-Histopatologia	-
		-Dosagem de IL-1 α	
- GI OECD nº 431 (corrosão dérmica) (artigo #1)	CP:SDS CN:PBS	-Histopatologia	-
		-Dosagem de IL-1 α	
- GI OECD nº 439 (irritação cutânea) (artigo #2)	CP:SDS CN:PBS	-Teste de Draize	-
- GI OECD nº 432 (fototoxicidade) (artigo #2)	A cultura celular com as NPs foi encubada tanto na presença quanto na ausência de UV.	-Teste <i>EpiDerm</i> TM	-
		- Teste de <i>in vivo</i>	
- GI OECD nº 442 B (sensibilização cutânea) (artigo #2)	CP: Eugenol CN: Grupo controle com o veículo.	-	-
		-	
- GI OECD nº 129 (toxicidade aguda) (artigo #3)	O meio celular contendo 10% de água deionizada foi usada como controle.	-Teste <i>in vivo</i>	
		- WST-1	
		-Coloração com iodeto de propídio	
		-ATP celular total	
- GI OECD nº 129 (toxicidade aguda) (artigo #4)	controles abióticos*** CP:SDS CN: células não tratadas.	-WST1	-Grande variação no tamanho das partículas, dependendo do meio; -A homogeneidade necessária para a dispersão da NPs fica muitas vezes comprometida, por conta das mudanças de comportamento das NPs conforme o meio de cultura utilizado.

* Coloca-se os reagentes do ensaio em contato com as NPs engenheiradas, sem as células, para observar a possibilidade de interferências das NPs com os reagentes.

Fonte: A autora, 2019.

Os resultados dos testes paralelos realizados em cada artigo apresentaram resultados concordantes com o método alternativo testado. As divergências observadas se restringiram aos ensaios de citotoxicidade, cujos resultados apresentaram alguma citotoxicidade por conta da

camada celular simples, diferente da barreira dérmica observada *in vivo* e nos tecidos RHE (LEHMANN et al., 2018; CHEN et al., 2019.)

O artigo #4, ao testar cada NP em água deionizada e em cada meio de cultura celular utilizado nos ensaios, observou a alteração de comportamento das NPs, um indicativo de interferência com o ensaio.

4.2.7 Teste de endotoxina bacteriana

Os artigos #5, #6, #7 e #8 tratam de avaliar a capacidade do Teste de Endotoxina Bacteriana de detectar endotoxinas - lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular externa de bactérias Gram negativas. LPSs são capazes de ativar monócitos e macrófagos, levando à produção de diversas citocinas promotoras do processo inflamatório. Os efeitos do processo inflamatório acontecem em graus variáveis. Pode haver febre e hipotensão, mas também, em casos mais severos, danos a determinados órgãos, choque séptico e desordens sistêmicas que podem levar à morte (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002 *apud* WESTPHAL; LUDERITZ, 1954).

Endotoxinas são uma forma de contaminação muito comum, presente, inclusive, dentro dos laboratórios (GORBET; SEFTON, 2005). Em se tratando de NPs, a extensa área de superfície das NPs favorece a adsorção de contaminantes (JONES; GRAINGER, 2009). Estudos apontam que cerca de um terço das formulações nanotecnológicas são reprovadas na fase pré-clínica pela alta concentração de endotoxinas (CRIST *et al.*, 2013). Além disso, alguns trabalhos já comprovaram que algumas NPs não causam efeitos inflamatórios por si só, mas são capazes de potencializar a propriedade inflamatória de pequenas doses de endotoxinas (INOUE *et al.*, 2007; DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2012).

A FB preconiza o teste de endotoxina bacteriana e o teste pirogênio (*in vivo*) para a avaliação pirogênica de produtos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). O teste de endotoxina bacteriana é um ensaio rápido e bastante confiável. β -glucanos são a única molécula que interferem com os kits comerciais LAL, mas a interferência pode ser evitada por meio da remoção do fator G, que reage aos β -glucanos (FARMACOPEIA AMERICANA, 2005).

Diversos estudos que abordam os efeitos biológicos de NPs na literatura não conseguiram avaliar ou não mencionaram a avaliação de endotoxinas nas NPs, de forma que a confiabilidade dos resultados fica comprometida (LI; FUJITA; BORASCHI, 2017). Li, Fujita e Boraschi (2017) testaram diversas NPs comerciais e também recebidas de colaboradores e identificaram a contaminação por endotoxinas nas NPs recebidas. Apenas um dos resultados

do presente estudo que envolviam as GIs da OECD (artigo #4) mencionou investigações sobre a presença de endotoxinas nas partículas e só um dos artigos que não investigaram endotoxinas (artigo #2) mencionou o fato como uma limitação.

O artigo #5 testou AuNPs estabilizadas em citrato (tamanho hidrodinâmico= $34,4 \pm 0,3$ nm), PMLA (ácido poli(*b*,*L*-málico)NPs (tamanho hidrodinâmico= $11,7 \pm 0,2$ nm), PMLA-PEG (polietilenoglicol)NPs (tamanho hidrodinâmico= $18,8 \pm 6,1$ nm) e dendrímeros de PAMAM (poliamidoamina) NPs (tamanho hidrodinâmico= $7,0 \pm 0,2$ nm) em diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana: gel, cromogênico limite e turbidimétrico cinético. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, constam na Tabela 7, do item 4.2.1. Os autores mencionam o processo de síntese das PMLA-PEGNPs, bem como sua purificação para evitar a presença de endotoxinas, pelo método Aida e Pabst. Cada NP foi testada para no mínimo quatro diluições. Cada rodada de teste de endotoxina bacteriana incluiu um conjunto de controles de qualidade. Controles positivos para cada ensaio foram preparados semeando quantidades conhecidas da endotoxina certificada padrão da farmacopeia americana em água destilada livre de endotoxinas. Os IECs foram preparados semeando a mesma quantidade da endotoxina padrão usada nos controles positivos nas NPs. Cada amostra de NP e IEC foi testada em duplicata e repetida três vezes. Os testes de endotoxina bacteriana são considerados válidos quando é possível obter-se uma recuperação de endotoxinas que esteja entre 50% de e 200% da quantidade semeada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Foi possível observar que, enquanto os resultados para dendrímeros de PAMAM são consistentes em diferentes versões do teste de endotoxina bacteriana, os resultados para PMLA-PEG NPs indicam mais de 25% de diferença entre a versão turbidimétrica e a colorimétrica. As AuNPs e PMLANPs tiveram o IEC de endotoxinas aceitável apenas na versão turbidimétrica, de forma que não foi possível a comparação com os demais tipos de teste de endotoxina bacteriana. Os autores também avaliaram a capacidade do teste após a purificação de PMLA-PEGNPs após o processo de extração de endotoxina Triton-X114, método de Aida e Pabst (AIDA; PABST, 1990). O resultado do teste de endotoxina bacteriana cromogênico e do cinético turbidimétrico foi negativo para ambos.

Os autores usaram o RPT para a confirmação dos resultados *in vitro* tanto da partícula purificada quanto para a divergência maior que 25% entre a versão turbidimétrica e a colorimétrica, obtida para as PMLA-PEGNPs. No primeiro caso, o RPT confirmou os resultados obtidos para o teste de endotoxina bacteriana cromogênico limite e para o cinético

turbidimétrico. O resultado do RPT para PMLA-PEGNPs confirmou o resultado do teste de endotoxina bacteriana cromogênico limite.

Os resultados mostraram que mesmo quando os requerimentos formais de validade do teste de endotoxina bacteriana são respeitados (neste caso de acordo com os protocolos *do Food and Drug Administration/USP*), os resultados para a mesma formulação de NPs podem diferir nas diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana. Ainda não se sabe que propriedades físicas provocam o aumento ou a inibição da detecção das endotoxinas. Os autores concluem enfatizando a necessidade do uso do RPT nos casos em que resultados *in vitro* de dois métodos diferentes divergem ou em casos em que apenas um formato de teste de endotoxina bacteriana é válido para determinada formulação. Esses dados também indicam a necessidade de um método que faça a detecção direta de endotoxinas para formulações contendo NPs.

O artigo #6 testou a detecção de endotoxinas numa nanoformulação micelar antineoplásica contendo cloridrato de irinotecano e *DSPE-mPEG₂₀₀₀* (1, 2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-metoxi-poli(etilenoglicol)) (distribuição de tamanho médio ~ 10 nm), por meio do teste de endotoxina bacteriana gelificação e do RPT. O estudo serve como referência para NPs micelares da classe PEG. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

As endotoxinas padrão utilizadas foram manufaturadas pelo órgão que controla drogas e alimentos chineses e a água utilizada era livre de endotoxinas. O estudo *in vitro* incluiu o teste de interferentes e o teste de endotoxinas. A concentração final utilizada foi 0,125 mg/ml. Os autores procederam ao teste em 3 grupos. O grupo 1 buscou confirmar a sensibilidade do teste de endotoxina bacteriana. Avaliou endotoxinas em concentrações variadas em água, tendo a água pura como controle negativo. Os grupos 2 e 3 avaliaram a possibilidade de interferência das NPs com os reagentes. No grupo 2, utilizou-se endotoxinas com o reagente 1, junto com as NPs e as endotoxinas em concentrações variadas, tendo como controle negativo o reagente 1 com as NPs. O grupo 3 usou endotoxinas com o reagente 2, junto com as NPs e as endotoxinas em concentrações variadas, tendo como controle negativo o reagente 2 com as NPs.

O grupo 1 reagiu conforme o esperado, de acordo com a concentração de endotoxina usada na contaminação. O grupo 2 mostrou que a sensibilidade do teste não está entre 0,25λ-2λ, o que indica que a diluição utilizada interfere no teste. O terceiro grupo revelou apenas resultados positivos, inclusive no controle negativo. Assim, os resultados mostraram que a diluição de 0,125 mg/ml interfere no teste de endotoxina bacteriana. Respeitando a máxima diluição válida (MDV), o teste foi considerado inadequado para esse tipo de substância.

Os autores seguiram, então, para o teste *in vivo*. O excipiente da formulação foi testado, inicialmente, e não interferiu com o teste de pirogênio. O RPT foi conduzido na concentração de 2,8 mg/ml da formulação (a maior dose utilizada na clínica) com a dosagem de 10 ml/kg de peso (o volume máximo foi utilizado para tentar garantir a segurança da nanoformulação). Como controle positivo, utilizou-se a droga cloridrato de irinotecano em si, em sua forma não nanoparticulada. Os três lotes testados resultaram na diminuição da temperatura corporal dos coelhos. Resultados semelhantes foram obtidos para a versão comercial da droga durante os testes para o estudo. Dados da literatura informados pelo autor confirmam o mesmo resultado para a versão da droga não nanoparticulada. Na tentativa de superar esse efeito, decidiram então repetir o RPT com a dosagem adequada agora, para 11 mg/ml num volume também reduzido, de 1 ml/kg. No novo teste não houve elevação de temperatura além do que o preconizado pela farmacopeia, logo, o resultado foi negativo e as amostras consideradas livres de pirogênio.

A literatura preconiza para o RPT a dosagem entre três e dez vezes a dose usada na clínica, com base no peso, desde que não interfira com o bem-estar dos animais. De acordo com essa informação, a dose administrada deveria ser de 33,6-112mg/kg. A segunda dosagem utilizada é a concentração utilizada na clínica com base no peso, buscando evitar a hipotermia nos coelhos. Mas, não se sabe se a estratégia pode ser aceitável, pois não há orientação direta na farmacopeia chinesa sobre a dosagem a ser utilizada no RPT. Os autores concluem indicando que o teste de endotoxina bacteriana gel não é recomendável para testar a nanoformulação e que o resultado do RPT coloca em dúvida a relevância do teste para humanos, por conta de falsos negativos. O estudo aponta a necessidade de outros métodos que possam avaliar a existência de endotoxinas na nanoformulação.

O artigo #7 buscou avaliar a capacidade do teste de endotoxina bacteriana, na versão gel, identificar adequadamente a presença de endotoxinas nas NPs, com atenção às possíveis interferências das NPs com o teste. Foram utilizadas 6 dispersões de NPs de sílica, puras (Sílica-1-25, Sílica -2, Sílica-3-80, Sílica-4-130, Sílica-5^f) (tamanho primário da partícula= $24,6 \pm 3,4$ nm; tamanho primário da partícula= entre 42 e 108 nm; tamanho primário da partícula= 80 ± 5 nm; tamanho primário da partícula= $128,3 \pm 11,0$ nm, tamanho primário da partícula= 113 ± 14 nm, respectivamente) ou peguiladas (revestidas por polietilenoglicol- Sílica-6 + PEG^f) (tamanho primário da partícula= 113 ± 14 nm) e 4 de óxido de ferro revestidas por sílica (FexOy@SiO2-1, FexOy@SiO2-2^f, FexOy@SiO2-3^f, FexOy@SiO2-4^f) (tamanho primário da partícula= 3-5 nm; tamanho primário da partícula= 3 - 5 nm; tamanho primário da partícula= 3 - 5 nm; -TEM/SEM tamanho primário da partícula=75 nm)

A intenção era comparar o comportamento de materiais com a mesma composição externa (sílica) *versus* as NPs peguiladas. Todas as NPs foram testadas na máxima diluição válida (62,5 µg/ml em água destilada) e ao menos uma outra concentração. Os autores também testaram o Endorem, uma formulação de NPs de óxido de ferro com partículas primárias de 5 nm, usada como material de referência em imagens de ressonância magnética para as NPs de óxido de ferro revestidas por sílica, cujo tamanho é cerca de 3 nm. Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

Após a síntese, as NPs foram purificadas por diálise com água ultra purificada livre de endotoxinas Milli-Q. Todos os materiais utilizados foram esterilizados e rotulados como livre de pirogênios pelos fabricantes. As suspensões de NPs foram elaboradas com água livre de endotoxinas. Os IECs foram realizados na MDV para todas as NPs e ao menos uma outra concentração. As NPs foram contaminadas com endotoxina padrão *Escherichia coli* O55:B5. Cada amostra de NP e IECs foi testada duas vezes.

O teste de triagem mostrou que as NPs geram o aumento da sensibilidade do teste por conta do aumento da atividade da cascata da coagulação do teste de endotoxina bacteriana. No entanto, o contato das NPs com o teste não é capaz de gerar a formação do gel com até uma hora de incubação, de forma que a presença de endotoxinas é necessária para que isso ocorra. As NPs foram testadas nas concentrações de 62,5µg/ml (MDV), 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml e 1000 µg/ml.

Quando em contato com endotoxinas, as NPs de óxido de ferro revestidas por sílica geraram um aumento da sensibilidade na detecção de endotoxinas de forma proporcional à concentração de NPs. Observou-se que nas partículas peguiladas, houve decréscimo do aumento da atividade da cascata de coagulação. A peguilação está relacionada com a inibição de atividade da cascata de coagulação do teste.

Altas concentrações de NPs de óxido de ferro revestidas por sílica, cujo tamanho original é de cerca de 3- 5 nm geraram a inibição do teste, visualizado pela não ocorrência de coagulação. Usando partículas maiores de óxido de ferro revestidas por sílica em concentrações de massa similares, esse efeito não foi observado. Em contraste, o Endorem, mesmo tendo partículas originais menores que as de óxido de ferro revestidas por sílica, não provocou completa inibição do ensaio. O mesmo resultado se apresentou quando a concentração dessas NPs foi elevada dez vezes em relação a das de óxido de ferro revestidas por sílica.

Para a maior parte das NPs de sílica testadas (Endorem, Sílica-1-25, Sílica-2, Sílica-3-80, Sílica-4-130, Sílica-5f, Sílica-6 + PEG), a amostra diluída respeitando a máxima diluição

válida foi suficiente para evitar o aumento de sensibilidade que invalidasse o teste. Assim, para essa NP foi possível a semiquantificação das endotoxinas presentes na amostra. No entanto, para uma das suspensões de sílica testadas (Sílica-4-130) e para todas as NPs de óxido de ferro revestidas por sílica (FexOy@SiO2-1, FexOy@SiO2^{2f}, FexOy@SiO2-3^f, FexOy@SiO2-4^f), mesmo usando a máxima diluição válida, a sensibilidade do teste foi alterada acima dos limites aceitáveis e, portanto, para esses casos, outros métodos de avaliação de endotoxinas devem ser preconizados. Assim, os autores concluíram que NPs cobertas por sílica podem interferir com o teste de endotoxina bacteriana gel e que o grau de aumento da geleificação foi variável para as NPs de mesmo material. Por isso, cada tipo de NP precisa ser, adequadamente, testado para inibição ou aumento nos ensaios biológicos. Resultados obtidos de uma NP não podem ser automaticamente transferidos para outras NPs de mesmo material. Quaisquer alterações físico-químicas, por menor que sejam, pode ocasionar a invalidade dos resultados. Como o teste de endotoxina bacteriana consiste de um meio biológico, é difícil tirar conclusões sobre os mecanismos que realmente ocasionam as alterações no resultado.

O artigo #8 buscou verificar a confiabilidade dos seguintes métodos de detecção de endotoxinas para NPs: teste de endotoxina bacteriana na versão gel, dois tipos de teste de endotoxina bacteriana cromogênicos (teste de endotoxina bacteriana cromogênico e *Endosafe-Portable Test System*), um método baseado no uso de células repórter que contêm o receptor TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) e o método de extração de endotoxinas para NPs descrito na norma ISO 29701:2010. Utilizou-se TiO₂NPs (distribuição de tamanho médio=15 ± 4 nm), AgNPs (distribuição de tamanho médio=25 a 80 - 90 nm); e CaCO₃NPs (distribuição de tamanho médio= 67 e 582 nm), adquiridos em pó, e SiO₂NPs em suspensão (distribuição de tamanho médio= 19 ± 4 nm, nas concentrações de 12,5 µg/ml, 50 µg/ml e 200 µg/ml). Os atributos de caracterização aferidos no estudo, bem como as concentrações utilizadas constam na Tabela 7, do item 4.2.1.

Todas as amostras em pó foram incubadas por quatro horas a 200°C, para a remoção das endotoxinas, de forma que funcionassem como controle negativo. Para os controles positivos, as NPs foram semeadas com quantidades conhecidas de endotoxinas. As suspensões foram elaboradas em água livre de endotoxinas. As endotoxinas utilizadas foram as das cepas *Escherichia coli* O55:B5 e O11B4.

No estudo do teste de endotoxina bacteriana gel, observou-se que CaCO₃NPs e SiO₂NPs apresentaram efeitos inibitórios substanciais no teste de endotoxina bacteriana, na concentração mais alta testada, de forma que os resultados estariam fora da faixa de 50 – 200%. As demais partículas permaneceram dentro dos limites. Todas as interferências observadas no experimento

foram resolvidas após a diluição das amostras para as concentrações de 12,5 µg/ml e 50 µg/ml. No entanto, vale salientar que a concentração de 200 µg/ml é relativamente frequente em estudos toxicológicos (THOMASSEN *et al.*, 2012; SANDBERG *et al.*, 2012) e, portanto, é indispensável um método adequado de endotoxinas para esta concentração (SMULDERS *et al.*, 2012).

Os testes de endotoxina bacteriana que envolvem colorimetria (teste de endotoxina bacteriana cromogênico e Endosafe-PTS) não apresentaram interferências significativas quando testados com NPs, o que levou os autores a considerarem como mais apropriados. Mas, observou-se no estudo #8, que TiO₂NPs e AgNPs aumentam a densidade óptica conforme a concentração é aumentada. Essa peculiaridade poderia ser erroneamente interpretada pelo teste como uma quantidade aumentada de endotoxina. Assim, para concentrações de NPs muito elevadas, esses métodos podem não ser confiáveis.

O método ISO 29701:2010 de extração de endotoxinas consiste num protocolo que busca reduzir a interferência das NPs no teste de endotoxina bacteriana. Após testar o método para baixa, média e alta concentrações de NPs, os autores do artigo #8 constataram que o procedimento se mostrou adequado para as concentrações baixa (0,2 µg/ml) e média (2 µg/ml), no entanto, não indicou capacidade de recuperação de endotoxinas para a alta concentração de 20 µg/ml, o que foi identificado como uma limitação. Os autores atribuem esse resultado ao fato de que a toxina agregada não pode ser lavada ou ao fato de parte dela permanecer no sedimento, capturada numa matriz de partículas, após a centrifugação.

O ensaio com as células repórter, também utilizado no artigo #8, tem como princípio a interação do lipídio A, responsável pela ligação com os TLR4 e responsável pelos efeitos biológicos dos LPS (LIEBERS; RAULF-HEIMSOOTH; BRUNING, 2008). Assim, a interação do lipídeo A com os receptores TLR4 estimulam a produção da enzima fosfatase alcalina embrionária, que pode ser facilmente quantificada por espectrofotometria pelo Quanti Blue™, kit comercial para a detecção e quantificação da fosfatase alcalina. O experimento com células repórter com receptores para TLR4 apresentaram completa recuperação de endotoxinas em todas as concentrações testadas. O modelo apresenta uma sensibilidade inicial de 0,05 EU/ ml, comparável aos ensaios teste de endotoxina bacteriana. Por isso, os autores recomendam o teste como um substitutivo ao modelo animal. Entretanto, como limitação do ensaio, os autores mencionam a possibilidade de efeitos citotóxicos causados pelas NPs no modelo celular. Observou-se também nas TiO₂ NPs (amostra incubada) e CaCO₃NPs (amostra incubada e não incubada) contaminadas com endotoxina, uma resposta aumentada em relação às amostras contaminadas e sem NPs. Os autores deduziram que a sedimentação das NPs durante a

incubação resulta em alta concentração de NPs, acompanhadas por altas concentrações de endotoxinas ligadas às partículas ou de endotoxina capturada na matriz das NPs, em extrema proximidade com as células.

Os resultados mostram que as NPs podem interferir com o teste de endotoxina bacteriana gel em doses elevadas, mas não excessivamente elevadas. Os testes de endotoxina bacteriana que envolvem colorimetria (teste de endotoxina bacteriana cromogênico e endosafe-PTS) e o teste com células TLR4 não apresentaram interferências significativas quando testados com NPs. Já o protocolo de extração de endotoxinas não se mostrou aplicável para altas concentrações de NPs. Dessa forma, os autores concluem que, deve-se adotar um método de detecção de acordo com a concentração de endotoxinas que se pretende testar.

A Tabela 9 aponta um resumo das formas de detecção de endotoxinas utilizadas em cada artigo.

Tabela 9 - Formas de detecção de endotoxinas utilizadas em cada artigo

Nº do artigo	Testes realizados em cada artigo
artigo #5	Teste de endotoxina bacteriana gel RPT
artigo #6	Teste de endotoxina bacteriana gel RPT
artigo #7	Teste de endotoxina bacteriana gel
artigo #8	Teste de endotoxina bacteriana gel Teste de endotoxina bacteriana cromogênico limite Teste de endotoxina bacteriana cromogênico Teste de endotoxina bacteriana turbidimétrico

Fonte: A autora, 2019.

A Tabela 10 resume os principais resultados encontrados para a avaliação do teste de endotoxina bacteriana, em suas diferentes modalidades, na detecção de endotoxinas em NPs

Tabela 10- Resultados de diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana para a detecção de endotoxinas em NPs (início)

Identificação do teste	NPs utilizadas	Resultados	Testes confirmatórios/observações
Teste de endotoxina bacteriana-gel	(artigo #5) AuNPs, PMLANPs, PMLA-PEGNPs e dendrímeros de PAMAM NPs	-Três das quatro NPs apresentaram IECs inaceitáveis (considerando as 4 diluições para cada NP).	RPT
	(artigo #6) <i>irinotecan hydrochloride and amphiphilic molecule DSPE-mPEG2000</i> NPs	-Identificou-se interferência das NPs com os reagentes do teste, mesmo na MDV.	RPT Embora tenha sido utilizado, a utilidade do RPT foi questionada.
	(artigo #7) seis dispersões de NPs de sílica puras ou peguiladas e 4 de óxido de ferro revestidas por sílica	-Cinco das dez NPs testadas apresentaram IECs inaceitáveis na MDV (62,5 µg/ml).	-NPs revestidas por sílica geraram um aumento da sensibilidade na detecção de endotoxinas de forma proporcional à concentração de NPs; -A peguilação está relacionada com a inibição de atividade da cascata de coagulação do teste; -Não foi constatada nenhuma correlação entre a composição da NP e seu tamanho e a interferência no teste.

Tabela 10- Resultados de diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana para a detecção de endotoxinas em NPs (continuação)

	NPs utilizadas	Resultados	Testes confirmatórios/observações
Teste de endotoxina bacteriana-gel	(artigo #8) (TiO ₂ NPs), (AgNPs e CaCO ₃ NPs) e (SiO ₂ NPs)	- (CaCO ₃ NPs) e (SiO ₂ NPs) apresentaram IEC inaceitável na concentração mais alta testada- Interferências cessaram para concentrações de 12,5 UE/ml e 50 UE/ml.	-
Teste de endotoxina bacteriana-cromogênico limite	(artigo #5) AuNPs, PMLANPs, PMLA-PEGNPs e dendrímeros de PAMAMNPs	-Duas das quatro NPs testadas apresentaram IEC inaceitável (considerando as 4 diluições para cada NPs).	-
Teste de endotoxina bacteriana-cromogênico	(artigo #8) TiO ₂ NPs, AgCaCO ₃ NPs e SiO ₂ NPs	-Não apresentaram interferências significativas em nenhuma das concentrações/amostras testadas.	-A turbidez aumentou conforme a concentração das partículas foi aumentada, o que pode ser erroneamente lido na leitura óptica como detecção de endotoxinas.
Teste de endotoxina bacteriana-turbidimétrico	(artigo #5) AuNPs, PMLANPs, PMLA-PEGNPs e dendrímeros de PAMAMNPs	-Sem interferências significativas para nenhuma das concentrações testadas.	RPT

Tabela 10 - Resultados de diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana para a detecção de endotoxinas em NPs (conclusão)

Identificação do teste	NPs utilizadas	Resultados	Testes confirmatórios/observações
Teste de endotoxina bacteriana endosafe- <i>Portable Test System</i>	(artigo #8) TiO ₂ NPs, AgNPs, CaCO ₃ NPs e SiO ₂ NPs	-Não apresentaram interferências significativas em nenhuma das concentrações/amostras testadas; -O método ISO, 2010 não indicou capacidade de recuperação de endotoxinas para a alta concentração testada.	-A turbidez aumentou conforme a concentração das partículas foi aumentada, o que pode ser erroneamente lido na leitura óptica como detecção de endotoxinas; -(AgNPs), (CaCO ₃ NPs) e (SiO ₂ NPs) não foram testadas em concentrações mais baixas pois apresentaram o máximo de recuperação de endotoxinas na concentração de 200 EU/ml.

Fonte: A autora, 2020.

A tabela 11 aponta os controles utilizados em cada estudo e interferências observadas.

Tabela 11- Controles utilizados em cada teste de endoxina bacteriana (início)

Testes objeto de estudo	Controles
Teste de endotoxina bacteriana-gel (artigo #5)	- Endotoxina padrão certificada pela farmacopeia americana; -Água livre de endotoxinas; -Sensibilidade dos testes de endotoxina bacteriana verificada; -CP: quantidades conhecidas da endotoxina certificada padrão da farmacopeia americana em água destilada livre de endotoxinas; - Os IECS preparados com concentrações conhecidas de endotoxinas.

Tabela 11- Controles utilizados em cada teste de endotoxina bacteriana (continuação)

Testes objeto de estudo	Controles
Teste de endotoxina bacteriana-gel (artigo #6)	<ul style="list-style-type: none"> - Endotoxina padrão manufaturada pelo órgão que controla drogas e alimentos chineses; -Água livre de endotoxinas; -Confirmação da sensibilidade do teste de endotoxina bacteriana informada pelo fabricante; -Triagem para verificar a possibilidade de interferência das NPs com os reagentes LAL (CPs foram preparados semeando quantidades conhecidas da endotoxina nas soluções com NPs).
Teste de endotoxina bacteriana-gel (artigo #7)	<ul style="list-style-type: none"> - As NPs sintetizadas pelos autores foram purificadas por diálise com água Milli-Q livre de endotoxinas, seguida por filtração estéril, em bancada estéril; -Os materiais utilizados na elaboração do teste LAL foram atestados como estéreis e rotulados como livre de pirogênios pelos fabricantes; -Triagem para verificar a possibilidade de interferência das NPs com os reagentes LAL; -IECs com concentrações conhecidas de endotoxinas (CP), usando a água livre de endotoxinas como CN; -Nos casos de resultados positivos, as amostras de NPs foram testadas também para β-glucanos, para verificar a possível interferência.
Teste de endotoxina bacteriana-gel (artigo #8)	<ul style="list-style-type: none"> -Água livre de endotoxinas; -CN: as amostras em pó foram incubadas por quatro horas a 200°C, para a remoção das endotoxinas; -IECs: quantidades conhecidas da endotoxina certificada padrão da farmacopeia americana em água destilada livre de endotoxinas (CP); -IECS preparados semeando a mesma quantidade da endotoxina padrão usada nos controles positivos nas NPs (CP).

Tabela 11- Controles utilizados em cada teste de endotoxina bacteriana (conclusão)

Testes objeto de estudo	Controles
Teste de endotoxina bacteriana- cromogênico limite (artigo #8)	-Água livre de endotoxinas; -CN: as amostras em pó foram incubadas por quatro horas a 200°C, para a remoção das endotoxinas. -IECs: quantidades conhecidas da endotoxina certificada padrão da farmacopeia americana em água destilada livre de endotoxinas (CP); -IECS preparados semeando a mesma quantidade da endotoxina padrão usada nos controles positivos nas NPs (CP).
Teste de endotoxina bacteriana- cromogênico (artigo #8)	IA*
Teste de endotoxina bacteriana- turbidimétrico (artigo #8)	IA*
Teste de endotoxina bacteriana- endosafe- <i>Portable Test System</i> (artigo #8)	IA*

*Idem ao anterior

Fonte: A autora, 2020.

O artigo #8 não verificou interferências significativas nos ensaios teste de endotoxina bacteriana que envolvem colorimetria (teste de endotoxina bacteriana cromogênico e endosafe-PTS) quando testados com NPs, mas identificou um aumento da densidade óptica das TiO₂NPs e AgNPs, conforme a concentração é aumentada. E pontuou a possibilidade de interferência e a necessidade de se ter um teste para endotoxinas que seja estável para concentrações elevadas de NPs, já que são comuns nos testes toxicológicos. Oostingh *et al.* (2011), confirmam que as propriedades físico-químicas das NPs podem interferir com a fluorescência (causa não identificada) e a leitura óptica dos ensaios. Mas, outras formas de interferência também foram identificadas em nossos resultados, embora nem todas tenham a causa conhecida.

Dados da literatura (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015) confirmam as interferências das NPs nos ensaios teste de endotoxina bacteriana, identificadas em ao menos uma modalidade de teste de endotoxina bacteriana, por todos os artigos que avaliaram contaminação por endotoxina selecionados neste estudo (#5, #6, #7 e #8). Os autores do artigo #5 enfatizaram que mesmo quando os requerimentos formais de validade do teste de endotoxina

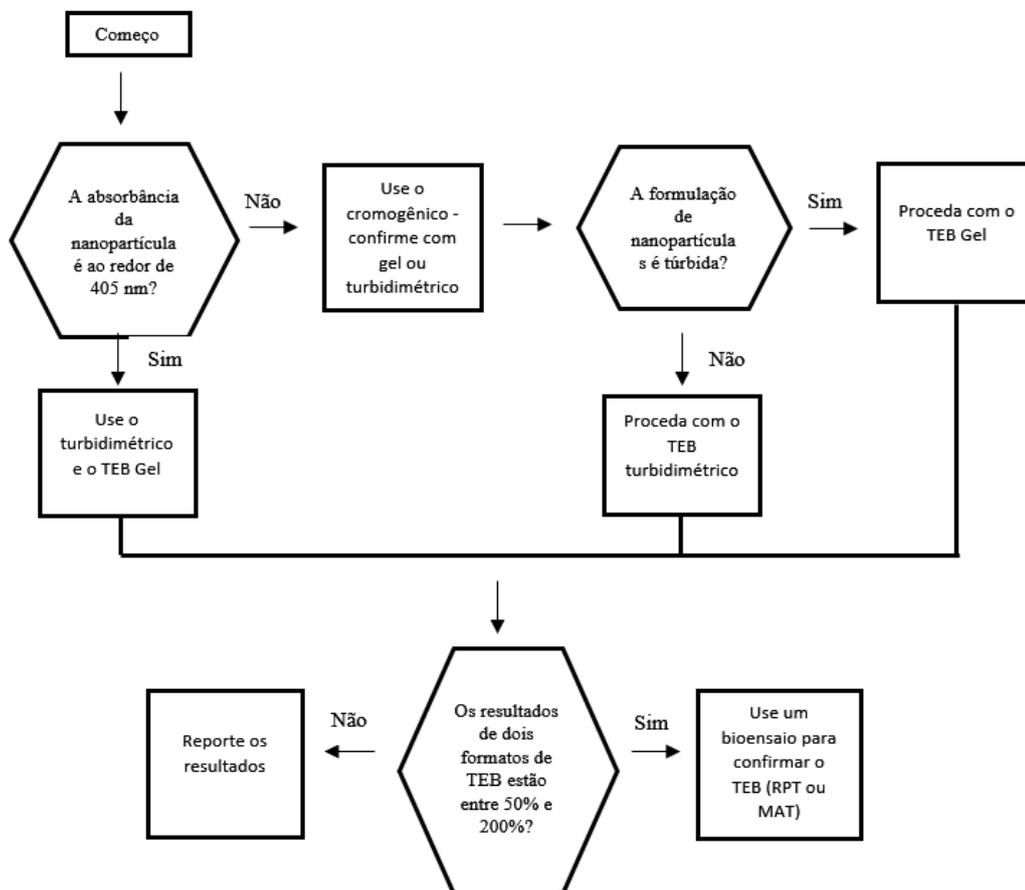
bacteriana são respeitados (neste caso, de acordo com os protocolos *do Food and Drug Administration/USP*), os resultados para a mesma formulação de NPs podem diferir nas diferentes modalidades de teste de endotoxina bacteriana.

O teste de endotoxina bacteriana gelificação, modalidade mais testada nos artigos estudados, apresentou IECs inaceitáveis para três dentre quatro tipos de NPs e para cinco dentre 10 NPs nos artigos #5 e #7, respectivamente. Além disso, apresentou interferências de seus reagentes com as NPs no artigo #6. O artigo #7 demonstrou que as NPs revestidas por sílica geraram um aumento da sensibilidade na detecção de endotoxinas de forma proporcional à concentração de NPs, o que gerou a inibição do teste de endotoxina bacteriana gel, visualizado pela não ocorrência de coagulação. Observou, ainda, que NPs de mesmo material e cuja característica comum era o pequeno tamanho apresentaram resultados divergentes com relação à inibição ou não do teste de endotoxina bacteriana gelificação, de forma que não foi possível correlacionar a interferência com a composição e o tamanho das NPs. O mesmo artigo, identificou que a pegulação das NPs está relacionada com a inibição de atividade da cascata de coagulação do teste.

Os dados obtidos dos ensaios de teste de endotoxina bacteriana, apontam grande dificuldade de se tirar conclusões genéricas em se tratando de experimentação com NPs e enfatizam a necessidade de controles adequados, além de mencionarem a diluição como uma possibilidade para a redução de interferências (artigo #8).

Algumas interferências com o teste de endotoxina bacteriana são previsíveis e podem ser superadas com a escolha do teste de endotoxina bacteriana apropriado. Sabendo que o teste de endotoxina bacteriana cromogênico é realizado num comprimento de onda de 405 nm, ele não deve ser adotado para avaliar NPs que possuam o espectro de absorbância em torno desse valor, por exemplo. Assim, Neum e Dobrovolskaia (2018) propuseram uma árvore decisória para auxiliar a tomada de decisão para a escolha mais adequada da modalidade de teste de endotoxina bacteriana de acordo com as propriedades físico-químicas das NPs (Figura 2). Para os autores, é necessário no mínimo 2 testes de endotoxina bacteriana de versões diferentes para esclarecer a avaliação. E ainda assim, devem ser confirmados por um teste biológico (RPT ou MAT), caso a diferença entre os resultados não esteja entre 50% e 200%. Desse modo, embora o RPT tenha sido eleito pelo artigo # 5 para esclarecer os resultados obtidos nos testes de endotoxina bacteriana, seria possível utilizar o MAT.

Figura 2- Árvore decisória para a escolha da modalidade de teste de endotoxina bacteriana mais apropriada para a nanoformulação



Fonte: adaptado de (NEUM; DOBROVOLSKAIA, 2018).

O MAT é um ensaio de alta sensibilidade e tem ótimo custo-benefício. Para Hartung e Sabbioni (2011), pode ser que o MAT, por ser um teste que usa suspensão celular, funcione melhor para testar NPs. Dobrovolskaia e McNeil (2012) verificaram que os resultados do MAT e do RPT concordavam entre si para diversas nanoformulações. Os bioensaios (MAT, PBMC e RPT) são adequados para a identificação de efeitos pirogênicos em geral, com foco em NPs de uso clínico. No entanto, sua característica de identificar pirogênios não endotoxinas não permite, nos ensaios laboratoriais, distinguir se a positividade do ensaio é de fato pela presença de endotoxinas ou por interferência das NPs (LI; FUJITA; BORASCHI, 2017). Por isso, Dobrovolskaia *et al.* (2014) sugeriram esses ensaios para confirmar os resultados dos testes de endotoxina bacteriana. A limitação do MAT e do PBMC é o uso apenas para nanoformulações que não sejam citotóxicas, já que isso inibiria a detecção de endotoxinas por este tipo de ensaio (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2014).

Embora os resultados MAT e do RPT tenham se mostrado concordantes entre si para diversas nanoformulações (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2012), um estudo conduzido com o teste de endotoxina bacteriana e o PBMC apontou que algumas NPs contaminadas com endotoxinas e identificadas pelo teste de endotoxina bacteriana, não foram detectadas como pirogênicas pelo PBMC (LI *et al.*, 2015). Os autores atribuem o fato a interferências das NPs com o ensaio, provavelmente interferindo na interação antígeno/anticorpo, adsorvendo IL-6 ou no sinal óptico responsável pela indicação da liberação de IL-6. Portanto, serão necessários mais estudos para adequada caracterização e validação de bioensaios *in vitro* para seu uso na detecção de endotoxinas (LI; FUJITA; BORASCHI, 2017).

Buscando evitar as distorções relacionadas ao uso de NPs nos resultados dos ensaios teste de endotoxina bacteriana ou ensaios que envolvam a dosagem de citocinas, é recomendável que se realize alguns testes-controle. Para identificar interferências na absorvância, luminescência ou fluorescência, é recomendável um teste que use inicialmente, apenas as NPs. Em sequência, deve-se testar uma amostra contendo as NPs mais os reagentes do ensaio, sem a matriz biológica, buscando evitar os falsos positivos decorrentes das ações catalíticas das NPs. Por último, deve-se utilizar os IECs, buscando identificar os falsos positivos e falsos negativos decorrente das interações das endotoxinas/citocinas com as NPs. O teste deve ser realizado para cada formulação de NP individualmente. Cada formulação, numa determinada matriz (água, líquido corporal ou meio celular), é contaminada com uma quantidade de endotoxina padrão do ensaio, em quantidade conhecida. O controle IEC deve ser comparado com o controle na mesma matriz contaminada apenas com a endotoxina padrão. Para NPs, é recomendável que se teste ao menos três concentrações diferentes (baixa, média e alta) (DOBROVOLSKAIA; GERMOLEC; WEAVER, 2009).

Nenhum teste *in vitro* foi validado ainda para avaliação de imunotoxicidade de NPs. Mas, no contexto atual, é razoável considerar a possibilidade de uma abordagem que envolva testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a compatibilidade de NPs com o sangue. É recomendável que se utilize diferentes espécies animais, pois as respostas entre as espécies podem variar significativamente. E ao utilizar matrizes humanas, é também aconselhável que se use entre sete e 10 doadores, para abranger a variedade de possibilidades de respostas entre os indivíduos. (DOBROVOLSKAIA; GERMOLEC; WEAVER, 2009). O artigo #6 concluiu que o teste da nanoformulação de interesse em coelhos, na concentração recomendada na literatura, levou à hipotermia nos animais. Embora tenham concluído por meio de dados bibliográficos que a causa provável seja a droga utilizada e não sua versão nanoformulada, a limitação do RPT foi apontada, na medida em que poderia gerar falsos negativos.

Em geral, os laboratórios e produtores de NPs não adotam nenhum protocolo para evitar a contaminação, o que aumenta, significativamente, as chances de contaminação (LI *et al.*, 2014). Uma das formas bastante comuns e efetivas de despirogeneização é a incineração e envolve o uso de altas temperaturas (WILLIAMS, 2007), o que se torna desafiador no contexto das NPs. Já se sabe que suas características físico-químicas podem ser alteradas no processo, afetando inclusive, sua toxicidade (FRANÇA *et al.*, 2010). O artigo #5 testa um processo de purificação para NPs que se mostrou eficiente. Entretanto, as características-físico-químicas não foram reavaliadas após o processo, de forma que não é possível saber se foram mantidas.

Estudos mostram que cuidados na síntese de NPs, envolvendo a despirogeneização dos materiais utilizados na produção podem frear a contaminação por endotoxinas (OOSTINGH *et al.*, 2011). Assim, no contexto atual, no qual ainda não há parâmetros bem definidos para a detecção adequada de endotoxinas em NPs, a sugestão é trabalhar na prevenção da contaminação de nanomateriais (VALLHOV *et al.*, 2006; LI; FUJITA; BORASCHI, 2017). Tanto pela adoção de protocolos para produtores, durante a síntese, quanto para ensaios que envolvam nanomedicina e nanosegurança. Paralelamente, é fundamental desenvolvimento de estratégias mais adequadas para a detecção de endotoxinas. (LI; FUJITA; BORASCHI, 2017; artigo #5).

Embora não seja objeto deste estudo, o artigo #4 classifica como promissor o ensaio em células repórter com receptores TLR4. Os autores mencionam como um fator limitador possíveis efeitos citotóxicos das NPs na cultura. Mas, deve-se adicionar às limitações o fato de a quantificação das endotoxinas ser realizada por espectrofotometria, também susceptível a interferências (OOSTINGH *et al.*, 2011).

4.2.8 Análise da caracterização das NPs

Foi possível observar que um mesmo estudo não informou os mesmos atributos para todas as NPs, como é o caso do artigo #1, tendo sido parte das análises realizadas pelos autores e outra parte informada com dados do fornecedor (Tabela 7, item 4.2.1). A pureza, atributo que é indicativo dos possíveis elementos contaminantes que podem influenciar, grandemente, na toxicidade do material, foi informada apenas no artigo #1, para apenas uma das NPs estudadas.

Os quatro atributos mais informados nos artigos foram: a) a composição; b) o tamanho médio das NPs (real ou hidrodinâmico) analisados por TEM/SEM ou DLS, mostrando certa homogeneidade nelas, por meio de micrografias ou pela própria determinação de tamanho médio, c) o revestimento de superfície e d) o potencial zeta, que indica se o recobrimento

(camada ou *shell*) que está na superfície do núcleo (*Core*) é uma capa positiva ou negativa. Por exemplo, umas SPIONs (do inglês, *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) recobertas com um biopolímero, em que os valores de potencial zeta são $\geq +25$ mV ou ≤ -25 mV, mostram boa estabilidade em suspensão; valores menores tendem a mostrar uma agregação formada por causa da atração interpartícula de van der Waals. Os agentes monodispersantes mais comuns usados nesses casos são o dextran, o starch, o polietileno glicol (PEG), a quitosana, além de moléculas orgânicas como os silanos, ácido cítrico, hormônios, anticorpos, ou mesmo o encapsulamento de biopolímeros na síntese das NPs (SAMROT *et al.*, 2021). Os objetivos do encapsulamento de NPs, como as SPIONs, são torná-las mais biocompatíveis ou o desenvolvimento de medicamentos de entrega controlada de uma quantidade de NPs ou fármacos à molécula alvo.

De acordo com Warheit (2008), boas práticas de estudos toxicológicos conduzidos com NPs devem priorizar sua caracterização físico-química com relação ao seu tamanho (estado seco), distribuição do tamanho (estado aquoso) no meio pertinente, dependendo da via de exposição, estrutura cristalina/cristalinidade, *status* de agregação no meio pertinente, composição/revestimento de superfície, reatividade de superfície, método de preparação do nanomaterial, incluindo modificações pós-síntese e pureza da amostra. Comparando os atributos mencionados em nossos resultados à referência mencionada, elaboramos a Tabela 12.

Tabela 12- Comparação dos atributos de caracterização de NPs identificados nos artigos com os que são considerados prioritários para Warheit (2008) (conclusão)

Atributos	Artigo							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Pureza	I*	NI**						
Fonte/origem do material	I*	NI**	I*	I*	NI**	NI**	NI**	NI**

*I- Informado

**NI – Não informado

***NA- Não se aplica

Fonte: A autora, 2021.

Considerando os atributos entendidos como primordiais (WARHEIT, 2008), o artigo #1 informou a distribuição do tamanho médio, a composição, a pureza e a fonte/origem do material e o status de agregação. Mas, esse último foi informado apenas para TiO₂NPs, dados fornecidos pela OECD, doadora desta NP. Já, o artigo #2, informou a distribuição do tamanho médio e a composição.

Os artigos #3 e #4, relataram, o tamanho hidrodinâmico, a distribuição de tamanho médio, a composição, a morfologia a carga superficial e a fonte/origem do material. Mas, o artigo #4 incluiu também o *status* de agregação e a avaliação de área superficial, além de informar o revestimento das NPs. No artigo #5, foram informados o tamanho hidrodinâmico, a carga superficial, a composição e a avaliação de área superficial. Já os artigos #6 e #7 avaliaram o tamanho hidrodinâmico, a distribuição do tamanho médio, a carga superficial e a composição. O artigo #7 incluiu, ainda, informações sobre o método de síntese do material e o revestimento de superfície. O artigo #8 informou, o tamanho hidrodinâmico, a distribuição de tamanho, a morfologia, a carga superficial, a composição e o método de síntese do nanomaterial. As NPs dos artigos #1, #2, #3, #5, #6 e #8 não possuíam revestimento. Por essa análise, ficou claro que grande parte dos atributos considerados essenciais por Warheit (2008) não foram contemplados nos artigos. Nenhum deles mencionou todos os atributos considerados relevantes pelo autor, e o artigo #4 foi o que apresentou a caracterização mais completa, não tendo mencionado apenas a estrutura cristalina/cristalinidade.

Muitos estudos acabam por relatar apenas: i) os dados de caracterização informados pelo fabricante, sem realizar uma investigação confirmatória e mais detalhada, ii) dados obtidos via microscopia eletrônica ou iii) dados obtidos por área de superfície (BET) (WARHEIT,

2008). Murdock *et al.* (2007) demonstraram a importância de que os materiais não sejam caracterizados apenas quando recebidos, mas também em soluções, antes da execução dos estudos toxicológicos, avaliando-se como os dados toxicológicos podem ser afetados por essas diferenças de propriedades das NPs. Identificaram que a dispersão não condizente afeta as NPs antes da dosagem e que o meio celular também impacta as propriedades das NPs.

Mais recentemente, segundo o documento: “*Regulação da nanotecnologia no Brasil e na União Europeia*”, de 2014, o Brasil e a OECD vêm desenvolvendo trabalhos com o objetivo de estabelecer pré-requisitos para estudos toxicológicos, identificação de características fundamentais de NPs, formas de medi-las e no desenvolvimento de materiais de referência (STEFANO; DURÁN, 2014). O documento discorre sobre atributos potencialmente importantes na avaliação toxicológica de diversos tipos de NPs, como os objetivos de se aferir um determinado atributo, a importância de se aferir determinado atributo em determinado contexto e a viabilidade de se aferir o atributo.

De acordo com o documento, para a avaliação de NPs na forma como foram fornecidas é essencial a avaliação da distribuição do tamanho, área de superfície, forma, composição química/pureza, heterogeneidade, superfície química, carga em suspensão/solução, estrutura cristalina. Na forma administrada, é essencial a avaliação da carga em suspensão/solução e do estado de aglomeração. Tanto *in vivo* como *in vitro*, é essencial avaliar a distribuição do tamanho.

Nenhum dos artigos selecionados informou integralmente os atributos considerados essenciais por Stefano e Durán (2014), para a forma fornecida das NPs e tampouco os atributos considerados essenciais para a forma administrada. O artigo#2 chega a mencionar a ocorrência de agregação no momento do contato das NPs com a pele, no entanto sem parâmetros metrológicos. Mas, a distribuição de tamanho após a administração das NPs, atributo indicado como essencial por Stefano e Durán (2014), não foi avaliada. No artigo #3, os autores informaram a estabilidade das AgNPs em perilíngua artificial, uma vez que a perilíngua seria o principal fluido com o qual as NPs teriam contato após sua administração. No entanto, a distribuição de tamanho das NPs após o contato com a perilíngua artificial não foi informada, o que seria essencial, de acordo com Stefano e Durán (2014). Além disso, os autores não realizaram a caracterização das NPs após seu contato com os meios de cultura celulares utilizados (DMEM contendo 4 mM de glutamina e suplementado com 10% de soro de bezerros recém-nascidos). O artigo #4 foi o único a informar a distribuição do tamanho das NPs após a administração nos meios de cultura celulares (*in vitro*), conforme preconizado por Stefano e Durán (2014), tendo aferido integralmente os atributos essenciais na forma após a

administração (*in vitro*). Assim, essa forma de caracterizar as NPs é muito mais complexa do que a proposta por Warheit (2008) e demanda ainda mais do que o que foi observado nos resultados encontrados.

A adequada caracterização de NPs é primordial num trabalho científico, uma vez que pequenas variações nas propriedades físico-químicas das NPs podem ocasionar diferenças significativas em suas propriedades e conseqüentemente em sua atividade biológica (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). A falta de métodos padronizados e protocolos adequados para a preparação de amostras são um entrave para a elucidação entre as relações das propriedades físico-químicas e sua toxicidade (OECD, 2019). Ademais, partículas de mesma composição “aparente” podem apresentar diferente potencial para causar danos (por exemplo, lotes ou bateladas de síntese diferentes). Por isso, a caracterização incompleta ou inadequada das NPs implica em experimentos, cujos resultados são irrelevantes ou limitados (WARHEIT, 2008). Para impedir que isso ocorra, é necessário investir na qualidade da preparação dessas NPs, caracterizando-as muito bem, a fim de garantir sua homogeneidade e verdadeira semelhança, assegurando a reprodutividade dos ensaios (MALHOTRA *et al.*, 2020). A variedade de métodos e a variedade de abordagens para a caracterização de NPs nos trabalhos científicos vêm gerando resultados diferentes, que dificultam as conclusões a partir da confrontação dos dados, gerando inconsistências (WARHEIT, 2008).

4.2.9 Perspectivas para avaliação toxicológica de NPs usando métodos alternativos

Embora a área de nanotoxicologia venha crescendo rapidamente, segue longe dos avanços da nanotecnologia (JORIS *et al.*, 2013). Para Hartung (2011), parece mais promissor adaptar os testes alternativos, atualmente, validados, aproveitando o conhecimento já adquiridos nos últimos anos de trabalho em produtos químicos, para que se obtenha uma gama de testes inicial. A OECD já está trabalhando em protocolos oficiais voltados para NPs (OECD, 2018), esforço que precisa do apoio da comunidade científica para o uso extensivo.

Em setembro de 2019, a Agência Federal Americana, *Environmental Protection Agency* (EPA) divulgou nova diretiva que prioriza os esforços para a redução do uso de animais de laboratório. As metas da agência envolvem a redução na demanda ou subsídio de estudos em mamíferos em 30% e a eliminação de estudos em mamíferos em 2035 (EPA, 2020). No cenário nacional, também em 2019, a EPISKIN, líder mundial em engenharia de tecidos para métodos alternativos, inaugurou sua subsidiária no Rio de Janeiro. A empresa produz não somente para o grupo L'Oréal, mas disponibiliza a tecnologia para outras empresas e para a

comunidade científica de forma geral. O grupo é pioneiro nos modelos RHE e participou da validação de diversos métodos alternativos na Europa (EPISKIN, 2020).

O contexto atual se mostra propício para o aprimoramento/desenvolvimento de métodos alternativos no Brasil e no exterior.

5 CONCLUSÃO

A análise dos dados levantados - relativos à avaliação da aplicabilidade de métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA para a avaliação toxicológica de NPs – nos permite concluir que:

1. Os estudos encontrados sobre RHE para avaliação de irritação cutânea e corrosão dérmica apontam convergências nas comparações realizadas entre o método alternativo e testes paralelos. O mesmo foi observado para o ensaio 3T3-NRU para avaliação de fototoxicidade e o LLNA: BrdU-ELISA para avaliação da sensibilização cutânea. Alguns autores fazem afirmações sobre a provável aplicabilidade da GI OECD nº 431 para corrosão dérmica (OECD, 2018), da GI OECD nº 432 para fototoxicidade (artigo #2 - CHOI *et al.*, 2011) e da GI OECD nº 442B para sensibilização cutânea (artigo #2 - CHOI *et al.*, 2011) em processos de avaliação de segurança de NPs. No entanto, essas informações devem ser consideradas com cautela, já que atributos de caracterização descritos como essenciais na literatura científica não foram, devidamente, aferidos nos estudos em questão. Nesse sentido, cabe ressaltar que a confiabilidade dos resultados de estudos envolvendo NPs está, diretamente, ligada à adequada caracterização físico-química e à compreensão do comportamento das NPs em diferentes meios, do contrário, existe a possibilidade de ocorrência de viés metodológico.
2. O ensaio *in vitro* 3T3-NRU deve ser aplicado com ressalvas e de fato é aconselhável apenas para estudos de triagem, onde se busca o estabelecimento preliminar de faixa de doses a serem empregadas em estudos de toxicidade *in vivo*, sendo essa uma característica desse ensaio, independente da substância-teste ser ou não uma NP.
3. O método farmacopeico teste de endotoxina bacteriana para a detecção de contaminação por endotoxinas deve ser utilizado com cautela na avaliação de NPs. À fim de se evitar interferências, recomenda-se o uso da árvore decisória de Dobrovolskaia, Germolec e Weaver (2009) e a realização dos testes-controle. Sabendo-se que a despirogeneização pode gerar alteração nos efeitos biológicos das NPs, sugere-se a prevenção da contaminação tanto no momento da síntese como no decorrer dos ensaios, por meio da elaboração de protocolos próprios, como a melhor opção no momento. É essencial que os pesquisadores passem a testar as NPs para verificar a possibilidade de contaminação por endotoxinas em suas matérias-primas. Por outro lado, um método mais adequado para a detecção se faz necessário.

4. Permanece a necessidade de um processo de caracterização mais completo para NPs, conforme orientam as referências que tratam da caracterização para estudos nanotoxicológicos. Dados sobre a estrutura cristalina/cristalinidade não foram identificados em nenhum dos estudos encontrados e devem ser reportados, bem como os de morfologia/forma, *status* de agregação, carga e área superficial, método de síntese, fonte/origem do material e pureza; atributos identificados neste trabalho como raramente reportados.
5. É urgente a formalização de protocolos internacionais específicos para NPs, inclusive para os testes de citotoxicidade. Estudos científicos sobre NPs que envolvam a aplicação das GIs da OECD são escassos, ou não são disponibilizados nas bases de dados científicos. Devem, portanto, ser estimulados na comunidade científica.
6. A maior parte das metodologias recuperadas neste trabalho abordou estudos *in vitro*; apenas um deles se deu em modelo *in vivo*. O fato indica que os métodos de substituição vêm sendo mais usados em comparação aos de redução e refinamento nos testes com NPs e materiais nanoestruturados. Vale, no entanto, lembrar que muitos dos testes *in vitro* são usados apenas como método de triagem e não substituem, plenamente, a utilização do modelo animal, que, muitas vezes, são aplicados num processo mais tardio e como meio de avaliação complementar/conclusiva.
7. Embora não tenha sido objeto deste estudo, o modelo RHE e o ensaio com células TLR4 foram apontados pelos autores como promissores para a avaliação de fototoxicidade e detecção de endotoxinas, respectivamente.
8. Por fim, o estudo se faz útil, primeiramente, para demonstrar que a adoção de estratégias de caracterização de NPs mais completas e padronizadas permanece como grande desafio mundial no campo da nanotoxicologia. O estudo também estimula a concentração de esforços nos testes que apontaram bons resultados e elucida quais ensaios estão sendo utilizados como ferramentas no momento, com suas ressalvas. Somado a isso, as precauções enumeradas acerca das endotoxinas e a necessidade identificada de investimento em metodologias protocolizadas, contribuem com o desenvolvimento das metodologias alternativas no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABD ELLAH, N.H.; ABOUELMAGD, S.A. Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges. **Expert Opin. DrugDeliv.** v.14, n. 2, p. 201-214, 2016.
- ABOUELMAGD, S.A.; YEO, Y. Nanoparticle-based Drug Delivery to Solid Tumors. *In*: MURO, S. (ed.). **Drug Delivery Across Physiological Barriers**. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Farmacopeia Brasileira, v. 1. **Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 298, de 12 de agosto de 2019**. Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**: versão 2. Brasília: ANVISA, 31 jan. 2013. 48 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>. Acesso em: 20 abr. 2019.
- AIDA, Y.; PABST, M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J. Immunol. Methods**, v.132, n. 2, p. 191-195, 1990.
- AIRES *et al.* **Histologia básica**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, CESAD, 2011. 13 p. [online]. Disponível em: https://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/10334028032012Histologia_Basica_Aula_1.pdf. Acesso em: 20 jun. 2020.
- ALBANESE, A; CHAN, W.C. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. **ACS Nano**, v. 5, n. 7, p. 5478-5489, 2011.
- ALMUTARY, A.; SANDERSON, B. J. S. The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 4, p.454-462, 2016.
- ANKLEY, G.T. *et al.* Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 3, p.730-741, 2010.
- ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, p. 151-165, 2012.
- ASHARANI, P.V. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v.3, p. 279-290, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT**, 2019. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/>. Acesso em: 20 jun. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BACTERIAL endotoxins test. *In*: UNITED STATES PHARMACOPEIA. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2005. Chapter 85.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression. perturbation in vitro-a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, p. 405-412, 2005.

BOOTZ, A. *et al.* Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 57, p. 369-375, 2004.

BOOTZ, A. *et al.* **J. Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 57, p.369, 2004.

BRADBURY, S.P; FEIJTEL, T.C; VAN LEEUWEN, C.J. Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 463-470, 2004.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. 5 de outubro de 1988, Brasília, DF. Título III, Capítulo VI. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em: 14 mar. 2019.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Seção 1, p. 1 (Publicação Original). Disponível em: <http://bit.ly/1WV52wP>. Acesso em: 9 abr. 2019.

BRASIL. Lei nº 13.097, de 19 de janeiro de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 jan 2015. Seção 1, p. 1-13. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/legislacao/Lei_n%C2%BA_13_097.pdf. Acesso em: 3 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 jul. 2012. Seção 1, p. 19. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/38460811/dou-secao-1-05-07-2012-pg-19>. Acesso em: 6 maio 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 3.459, de 26 de julho de 2019. Institui a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia, como principal programa estratégico para incentivo da Nanotecnologia no país. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção 1, nº 152, 8 de agosto de 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Relatório sobre as iniciativas e ações destinadas a regular a nanotecnologia no Brasil e na União Europeia: diálogos setoriais União Europeia– Brasil**. Reino Unido/Brasil, novembro de 2014. 71 p.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 fev. 2016. Seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 jul. 2014. Seção 1, p.51 e 52. Disponível em:
http://www.mct.gov.br/upd_blob/0231/231859.pdf. Acesso em: 17 abr. 2019.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 35, de 7 de agosto de 2015. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial da União**, Brasília, em 10 ago. 2015. Edição: 151, seção: 1, p. 44.

BRASIL. Resolução Normativa nº 18, de 24 setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, em 25 set. 2014. p.9. Disponível em:
http://www.mct.gov.br/upd_blob/0234/234796.pdf. Acesso em: 10 maio 2019.

BRASIL. Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, em 10 maio 2019. p. 4. Disponível em:
http://www.mct.gov.br/upd_blob/0240/240027.pdf. Acesso em: 10 maio 2019.

BRASIL. Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 jul 2014, Seção I, p. 51. Disponível em:
https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_17_de_03072014.html. Acesso em: 28 maio 2019.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2009. [online}. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato20072010/2009/Decreto/D6899.htm. Acesso em: 30 abr. 2019.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 8.932, de 14 de dezembro de 2016. Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções de Confiança da

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, remaneja cargos em comissão e funções de confiança, substitui cargos em comissão do Grupo Direção e Assessoramento Superiores - DAS por Funções Comissionadas do Poder Executivo - FCPE. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 dez. 2016, p. 20. Disponível em:

http://legislacao.planalto.gov.br/legisla/legislacao.nsf/Viw_Identificacao/DEC%208.932-2016?OpenDocument. Acesso em: 25 maio 2019.

BRASIL. Presidência da República. 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BROOKS R; WIMHURST J; RUSHTON N. Endotoxin contamination of particles produces misleading inflammatory cytokine responses from macrophages in vitro. **J Bone Joint Surg Br**, v. 84, n. 2, p. 295-9, 2002.

BROWN, S. C., *et al.* Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity. **Adv. Poder Techno.**, v. 18, p. 69-79, 2007.

BRUNO, A. N. **Biotecnologia I**: princípios e métodos. Porto Alegre: Artmed, 2014. 244 p.

BUZEA, C; BLANDINO, I.I. P; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4 p. MR17 - MR172, 2007.

CALZOLAI, L.; GILLILAND, D.; ROSSI, F. Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review. Food additives & contaminants. **Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment: Part A**, v.29, n. 8, p. 1183-1193, jun. 2012.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA C.L.; ZAMBRONE F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, jul./set., 2004.

CHEN, L. *et al.* Skin Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles in a 3D Epidermal Model Compared to 2D Keratinocytes. **Int J Nanomedicine**, v.14, p. 9707-9719, 2019.

CHOI, J. *et al.* A safety assessment of phototoxicity and sensitization of SiO₂ Nanoparticles. **Mol Cell Toxicol**, v. 7, p. 171-176, 2011.

CHOI, J., *et al.* Skin corrosion and irritation test of sunscreen nanoparticles using reconstructed 3D human skin model. **Environmental Health and Toxicology**, v. 29, p. 2014004, 2014.

COSTA, E.G.; ROZENFELD S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. *In*: ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

CRIST, R.M., *et al.* Common pit falls in nanotechnology: lessons learned from NCI's Nanotechnology Characterization Laboratory. **Integr Biol.**, v.5, n. 1, p. 66-73, 2013.

CROSERA, M; PRODIA; MAURO, M. *et al.* Titanium Dioxide Nanoparticle Penetration into the Skin and Effects on HaCaT Cells. **Int J Environ Res Public Health.**, v. 12, n. 8, p.9282-9297, 2015.

DANESHIAN, M.; von AULOCK, S.; HARTUNG T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. **Nature Protocols**, n. 4, p.1709 - 1721, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.159>. Acesso em: 19 set. 2017.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Desafios atuais da pesquisa em toxicologia: Avaliação da toxicidade de nanomateriais manufaturados para o desenvolvimento. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1, n. 4, p. 11-24, 2013.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist. **Intern. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 457-499, 1998.

DOBROVOLSKAIA, M. A, *et al.* Dendrimer-induced leukocyte procoagulant activity depends on particle size and surface charge. **Nanomedicine**, v. 7, n. 2, p. 245-256, 2012.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotech.** v. 2, p. 469-478, 2007.

DOBROVOLSKAIA, M.A. *et al.* Ambiguities in applying traditional Limulus amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. **Nanomedicine**, v.5, n. 4, p. 555-62, 2010.

DOBROVOLSKAIA, M.A., *et al.* Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation. **Nanomedicine**, v.9, n.12, p. 1847-56, 2014.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; MCNEIL, S.E. Nanoparticles and endotoxin. **Front. Nanobiomed. Res.**, v. 1, p.77-110, 2012.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; GERMOLEC, D.R.; WEAVER, J.L. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. **Nature Nanotechnology**, v. 4, 2009.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v.4, p. 903-914, 2002.

DOCTER, D.; WESTMEIR, D.; MARKIEWICZ, M., *et al.* The nanoparticle biomolecule corona – lessons learned – challenge accepted? **ChemSocver**, v. 44, p. 6094-6121, 2015.

SAFENANO, S. M. H.; DURÁN, N. **Regulação da nanotecnologia no Brasil e na União Europeia**. Rio de Janeiro: Universidade Estadual de Campinas, 2014. (Diálogos Setoriais União Europeia – Brasil).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Dispõe sobre as novas determinações para a eliminação de testes em animais e redução de seu financiamento**. 2020. Disponível em: <https://www.epa.gov/research/efforts-reduce-animal-testing-epa>. Acesso em: 30 maio 2020.

EPISKIN. **Dispõe sobre a inauguração da subsidiária EPISKIN no Brasil.** 2020.

Disponível em: <https://www.episkin.com/br/News/EPISKIN%20new%20laboratories%20in%20Brasil>. Acesso em: 05 jun. 2020.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 5. Strasbourg: Council of Europe, 2017.

FARCAL, L. *et al.* Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy. **PLoSOne**, v.10, n. 5, e0127174, 2015.

FEIJÓ, A.G.S.; BRAGA, L.G.M.; PITREZ, P.M.C. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos.** Porto Alegre: Ed. EDIPUCRS, 2010.

FENNRICH, S.; WENDEL, A.; HARTUNG, T. New applications of the human whole blood pyrogen assay (pyrocheck). **ALTEX**, v. 16, n. 3, p.146-149, 1999. Disponível em: http://www.altex.ch/resources/altex_1999_3_146_149_Fennrich.pdf. Acesso em: 11 nov. 2017.

FRANÇA, A, *et al.* Sterilization matters: consequences of different sterilization techniques on gold nanoparticles. **Small**, v.6, n.1, p. 89-95, 2010.

GERSTNER, W. Crystal form and particle size of organic pigments in printing inks and paints. **J Oil Col Chem Assoc**, v. 49, p. 954-973, 1966.

GLOBALY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICALS (GHS). **Sobre o Sistema Globalizado harmonizado de Classificação de produtos químicos.** 2020. Disponível em: <http://ghs-sga.com/?lang=pt-br>. Acesso em: 06 maio 2020.

GOH, C.L.; SOH, S.D. Occupational dermatoses in Singapore. **Contact Dermatitis**, v. 5, p. 288-293, 1984.

GORBET MB; SEFTON M.V. Endotoxin: the uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811-6817, 2005.

GUADAGNINI, R. *et al.* Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. **Nanotoxicology**, v. 9, Suppl 1, p.13-24, 2013.

GUJRATI, M. *et al.* Multifunctional cationic lipid-based nanoparticles facilitate endosomal escape and reduction-triggered cytosolic siRNA release. **Mol. Pharm.**, v. 11, p. 2734-2744, 2014.

GUO, D., XIE, G., LUO, J. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. **J. Phys. D Appl. Phys**, v. 47, n. 13001, p. 1-25, 2014.

HA, S.-W.; WEITZMANN, M.N.; BECK, G.R.J. Dental and Skeletal Applications of Silica-Based Nanomaterials. *In*: SUBRAMANI, K., AHMED, W. **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry.** Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 70-86.

HALL, M. Of the Principles of Investigation in Physiology. **Circulation**, v. 48, p. 651-54, 1973. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/01.CIR.48.3.651>. Acesso em: 01 jun. 2020.

HARTUNG, T., *et al.* Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. The report and recommendations of ECVAM Workshop 43. European Centre for the Validation of Alternative Methods. **ATLA**, v. 29, n. 2, p. 99123, 2001.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. **Nature**, v. 460, p. 208-212. SCCS, 2012.

HARTUNG, T.; SABBIONI, E. Alternative in vitro assays in nanomaterial toxicology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 3, n. 6, p. 545-573, 2011.

HARTUNG, T.; WENDEL, A. Detection of Pyrogens Using Human Whole Blood. **ALTEX**, v. 12, n. 2, p.70-75, 1995.

HASIWA, N. *et al.* Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. **ALTEX**, v. 3, n. 2, p. 169-208, 2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>.

HAYDEN, P.J. *et al.* Application of MatTek In Vitro Reconstructed HumanSkin Models for Safety, Efficacy Screening, and Basic Preclinical Research. **Applied in vitro Toxicology**. v.1, n.3, 2015.

HOFFMANN, S. *et al.* International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. **J. Immunol. Methods**, v. 298, p. 161-73, 2005.

HRISTOZOV, D.R. *et al.* A weight of evidence approaches for hazard screening of engineered nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 8, n.1, p.72-87, 2014.

INOUE, K., *et al.* Effects of inhaled nanoparticles on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **Toxicology**, v. 238, n. 2-3, p. 99-110, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **Portaria nº 29, de 14 de agosto de 2013**. Institui o Centro Brasileiro para a Validação de Métodos Alternativos (BRACVAM). Rio de Janeiro: INCQS, 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 29701**: Nanotechnologies - Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems - Limulus amebocyte lysate (LAL) test. Geneva, 2010.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein J. Nanotechnol.**, v. 9, p.1050-1074, 2018.

JIN., Y. *et al.* LAL test and RPT for endotoxin detection of CPT-11/DSPE-mPEG2000 nanoformulation: What if traditional methods are not applicable? **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, issue 3, p. 289-296, 2018.

JONES C.F., GRAINGER D.W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 6, p.438-56, 2009.

JORIS, F. *et al.* Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. **Chem Soc Rev.**, v. 42, n. 21, p. 8339-8359, 2013.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications, and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 12, i. 7, p. 908-931.

KIM, H. *et al.* Skin Corrosion and Irritation Test of Nanoparticles Using Reconstructed Three-Dimensional Human Skin Model, **EpiDermTM**. v. 32, n. 4, p. 311-316, 2016.

KISHORE, A. S.; SUREKHA P.; MURTHY, P. B. Assessment of the dermal and ocular irritation potential of multi-walled carbon nanotubes by using in vitro and in vivo methods. **Toxicology Letters**,v. 191, p. 268-274, 2009.

KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical Properties of Metal Clusters**. Berlin: Springer, 1995.

KREWSKI D. *et al.* Toxicity testing in the 21st century: A vision and a strategy. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**. v. 13, n. 2-4, p. 51-138, 2010.

KROLL, A. *et al.* Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. **Arch Toxicol**, v. 86, p. 1123-1136, 2012.

KUCKI, M.; CAVELIUS, C.; KRAEGELOH, A. Interference of silica nanoparticles with the traditional Limulus ameobocyte lysate gel clot assay. **Innate Immunity**, v. 20, n. 3, p. 327-336, 2014.

LANDSIEDEL, R. *et al.* Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays with in vivo inhalation or instillation studies. **Nanomed.**,v. 9, p. 2557-85, 2014.

LEHMANN, S.G. *et al.* In Vitro Dermal Safety Assessment of Silver Nanowires after Acute Exposure: Tissue vs. Cell Models. **Nanomaterials**, v. 8, 232, 2018.

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

LI, C.*et al.* Development and Validation of a Method for Determination of Encapsulation Efficiency of CPT-11/DSPE-mPEG2000 Nanoparticles. **Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p.345-348, jan. 2016.

LI, S.-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Mol. Pharm.**, v.5, p. 496-504, 2008.

LI, Y.; FUJITA, M.; BORASCHI, D. Endotoxin Contamination in Nanomaterials Leads to the Misinterpretation of Immunosafety Results, **Frontiers in Immunology**, v.8, p. 472, 2017.

LI, Y.*et al.* Assessing the immunosafety of engineered nanoparticles with a novel in vitro model based on human primary monocytes. **ACS Appl Mater Interfaces**, v.8, n. 42, p.28437-47, 2016.

LI, Y.*et al.* **Bacterial endotoxin binds to the surface of gold nanoparticles and triggers inflammation.** 7th International Nanotoxicology Congress – Nanotox 2014; Antalya, Turkey, 2014.

LI, Y.*et al.* Optimising the use of commercial LAL assays for the analysis of endotoxin contamination in metal colloids and metal oxide nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 4, p. 462-73, 2015.

LIEBERS V.; RAULF-HEIMSOTH M.; BRUNING T. Health effects due to endotoxin inhalation (review). **Arch Toxicol**, v. 82, p. 203-210, 2008.

LIMBACH, L. K. *et al.* **Environ. Sci. Technol.** v. 39, n. 3, p.9370-9376, 2005.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A., **Annu. Rev. Phys. Chem.**, 54, 331. 2003.

MABENA, L.F. *et al.* Nitrogen-doped carbon nanotubes as a metal catalyst support. **ApplNanosci**, v. 1, p. 67-77, 2011.

MAGALHÃES, P. O. *et al.* Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.10, n.3, p.388-404, 2007.

MANNERSTRÖM M *et al.* The applicability of conventional cytotoxicity assays to predict safety/toxicity of mesoporous silica nanoparticles, silver and gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes. **Toxicol In Vitro**, v. 37, p.113-120, 2016.

MATTEK. In Vitro **EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)**.2019. 35p. Disponível em: <https://www.mattek.com/application/skin-irritation-test-oecd-439/>. Acesso em: 03 jul. 2020.

MIE, G. “Beiträge zur Optik über Medien, speziellkolloidaler Metalllösungen,” **Annal. Physik**, v.25, p.377-445.1908.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES, 2020. **Dispõe sobre as recentes ações do MCTIC na Iniciativa Brasileira de nanotecnologia.** Disponível em: http://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html?searchRef=nanotecnologia&tipoBusca=expressaoExata. Acesso em: 01 set. 2020.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES, 2020. **Dispõe sobre as recentes ações do MCTIC na Iniciativa Brasileira de nanotecnologia.** Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html. Acesso em: 10 dez. 2019.

MIYANI, V. A.; HUGHES. M.F. Assessment of the in vitro dermal irritation potential of cerium, silver and titanium nanoparticles in a human skin equivalent model. **Cutan Ocul Toxicol**, v. 36, n. 2, p. 145-151, 2017.

MOHAMMED YH; HOLMES A; HARIDASS IN, *et al.* Support for the Safe Use of Zinc Oxide Nanoparticle Sunscreens: Lack of Skin Penetration or Cellular Toxicity after Repeated Application in Volunteers. **J Invest Dermatol**, v. 139, n. 2, p. 308-315, 2019.

MOHER, D. *et al.* **Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement.** 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1000097>. Acesso em: 21 set 2020.

MONOCYTE Activation test. *In: THE EUROPEAN Pharmacopoeia.* 7th. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010. Chapter 2.6.30.

MONOPOLI, M.P. *et al.* Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nat Nanotechnol.**, v. 7, p. 779-86, 2012.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; INMAN, A.O.; ZHANG, L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicol.Appl. Pharmacol.**, v. 234, p. 222-235, 2009.

MORALES, R.P. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). **Rev Cubana Farm.**, v.38, n.1, p. 1-1, 2004.

NADWORNYY, P.L. *et al.* Does nanocrystalline silver have a transferable effect? **Wound Repair Regen.**, v. 18, n. 2, p. 254-265, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy.** Washington, DC: National Academies Press, 2007.

NELL, I.E., *et al.* A multi-stakeholder perspective on the use of alternative test strategies for nanomaterial safety assessment. **ACS Nano**, v.7, n.8, p. 6422-6433, 2013.

NEUN B.W., DOBROVOLSKAIA MA. Considerations and Some Practical Solutions to Overcome Nanoparticle Interference with LAL Assays and to Avoid Endotoxin Contamination in Nanoformulations. **Methods Mol Biol.**, v. 1682, p.23-33, 2018.

NGOY, J.M. *et al.* A CO₂ capture technology using multi-walled carbon nanotubes with polyaspartamidesurfactant. **Energy Procedia**, v.63, p. 2230-2248, 2014.

NOGUEIRA, D.R. *et al.* Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies. **Nanomaterials**, v. 4, p.454-484, 2014.

OECD. **Workshop Report Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, n. 63**

OECD. **Test No. 421:** Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264264380-en>. Acesso em: 22 jun. 2019.

OECD. **Test No. 432:** In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 492:** Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264242548-en>. Acesso em: 23 jun. 2019.

OECD. **Test No. 435:** In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Publishing, Paris, 2006. [online]. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264067318-en>. Acesso em: 1 jun. 2019.

OECD. **Test No. 438:** Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264203860-en>. Acesso em: 20 jun. 2019.

OECD. **Test No. 420:** Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>. Acesso em: 9 jun. 2019.

OECD. **Test No. 442D:** In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>. Acesso em: 22 jun. 2019.

OECD. **Test No. 491:** Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264242432-en>. Acesso em: 3 jun. 2019.

OECD. **Guiding principles for measurements and reporting for nanomaterials:** physical chemical parameters. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 91. OECD Publishing, Paris, 2019. 41p.

OECD. **Physical-Chemical decision framework to inform decisions for risk assessment of manufactured nanomaterials.** Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 90. OECD Publishing, Paris, 2019. 42p.

OECD. **Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 85 Evaluation of in vitro methods for human hazard assessment applied in the OECD testing programme for the safety of manufactured nanomaterials.** OECD Publishing, Paris, 2018.

OECD. **Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials.** No. 15 Paris 2009.

OECD. **Test No. 423:** Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>. Acesso em: 4 jun. 2019.

OECD. **Test No. 429:** Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071100-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 430:** In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). OECD Publishing, Paris, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071124-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 431:** In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 442A:** Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 442B:** Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or – FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>. Acesso em: 18 jun. 2019.

OECD. **Test No. 442C:** In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2019. [online]. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>. Acesso em: 11 jun. 2019.

OECD. **Test No. 460:** Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2017.

OECD. **Test No. 439:** In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>. Acesso em: 5 jun. 2019.

OECD. **Test No. 487:** In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264091016-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 422:** Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. OECD Publishing, Paris, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264070981-en>. Acesso em: 15 jun. 2019.

OECD. **Test No. 428:** Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>. Acesso em: 7 jun. 2019.

OECD. **Test No. 425:** Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>. Acesso em: 13 jun 2019.

OECD. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. **Report 27:** List of manufactured nanomaterials and list of endpoints for phase one of the sponsorship programme for the testing of manufactured nanomaterials: revision. OECD Publishing, Paris, 2010.

OOSTINGH, G.J. *et al.* Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. **Part FibreToxicol**, v.8, n. 1, p. 8, 2011.

PARK Y.H. *et al.* Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1863-1869, 2011.

PARK Y.H. *et al.* Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model. **Toxicology**, v. 267, p. 178-181, 2010.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

PERDOMO-MORALES, R.; PARDO-RUIZ, Z.; SPREITZER, I. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin. **ALTEX**, v. 28, n. 3, p. 227-235, 2011. Disponível em: http://www.altex.ch/resources/altex_2011_3_227_235_Perdomo2.pdf. Acesso em: 11 out. 2017.

PERKINS, M.A. *et al.* A non-invasive method to assess skin irritation and compromised skin conditions using simple tape adsorption of molecular markers of inflammation. **Skin Res. Technol.**, v.7, n. 4, p. 227-237, 2002.

PHYSICAL-CHEMICAL DECISION FRAMEWORK TO INFORM DECISIONS FOR RISK ASSESSMENT OF MANUFACTURED NANOMATERIALS. **Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 90**. Paris, 2019

PIMENTA, M.A.; MELO, C.P. Nanociências e nanotecnologia. **Ciência e Natura Especial**, UFSM, v. 29, p. 9-20, 2007.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 179-216.

POOL, E.J. *et al.* The detection of pyrogens in blood products using an ex vivo whole blood culture assay. **Journal of Immunoassay**, v. 19, p. 95-111, 1998.

POWERS, K. W. *et al.* Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicol.Sci.**, v. 90, p.296.2006.

PRASHANT, K.J.; IVAN, H.S. Au NPs target cancer. **Nanotoday**, v. 2, p. 19-29, 2007.

PRESGRAVE, O.A.F. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2003.

PRESGRAVE, O.A.F. **Proposta de criação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos: formação, estrutura e funcionamento**. 2012. 136 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.p. 24-34.

PURI, A. *et al.* Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** v. 26, p. 523-580, 2009.

R. HAO *et al.* Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles, **Adv. Mater.**, v.22, n. 25, p. 2729-2742, 2010.

RAMOS, M F Hetal. Caracterização das pesquisas sobre eficácia coletiva docente na perspectiva da teoria social cognitiva. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 91-99, jan./mar, 2015.

REDDY, S. T. *et al.* Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. **Nature Biotechnol.**, v. 25, p. 1159-1164, 2007.

ROEBBEN, *et al.* Reference materials and representative test materials to develop nanoparticle characterization methods: the NanoChOp Project case. **Frontiers in Chemistry**, v.3, Article 56. p.1-16, 2015.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta paul. Enferm**, v. 20, n. 2, p. v-vi, 2007.

RYAN, C.A., *et al.* Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. **Toxicology Letters**, v. 150, n. 3, p. 301-316, 2004.

SAEED, K.; KHAN, I. Preparation and characterization of singlewalled carbon nanotube/nylon 6,6 nanocomposites. **Instrum Sci. Technol.**, v.44, p. 435-444. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10739149.2015.1127256>.

SANDBERG, W.J. *et al.* Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1ss release from macrophages. **PartFibreToxicol**, v. 9, n. 32,2012.

SANTOS, C.M. C.*et al.* A estratégia pico para a construção da pergunta de pesquisa e busca de evidências. **Rev Latino-am. Enfermagem**, v.15, n. 3, 2007.

SHATKIN, J.A.; KIM, B. Cellulose nanomaterials: life cycle risk assessment, and environmental health and safety roadmap. **Environ. Sci. Nano**, v. 2, p. 477-499, 2015.

SIGMA-ALDRICH, 2020.**Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html>. Acesso em: 20 jun. 2020.

SIGMUND, W. Processing and Structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 89, p. 395-407, 2006.

SILVA, C.C. **Avaliação da contaminação pirogênica em soros hiperimunes e ambientes sujeitos a vigilância sanitária**: comparação dos métodos in vitro e in vivo aplicados ao controle da qualidade. 2015. 213 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) –Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

SINGH, N.A. Nanotechnology Innovations, Industrial Applications and Patents. **Environmental Chemistry Letters**. v. 15, p. 185-191, 2017.

SMULDERS, S., *et al.* Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 9, n. 41, p. 1-11, 2012.

SPREITZER, I. *et al.* **10 Years of experience with alternative pyrogen tests (monocyte activation tests)**. Proceeding's 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Tokyo, 2007.587 p.

STAMM, H.; GIBSON, N.; ANKLAM, E. Detection of nanomaterials in food and consumer products: bridging the gap from legislation to enforcement. Food additives & contaminants. **Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**. v.29, n.8, p.1175-82, Aug. 2012.

STATNANO. 2018. **Nanotechnology Products Database (StatNano)**. Introduction. Disponível em: <https://product.statnano.com/>. Acesso em: 28 ago. 2020.

STEFANIAK, A.B. *et al.* Nanoscale reference materials for environmental, health and safety measurements: needs, gaps and opportunities. **Nanotoxicology**, p.1-13, 2012.

STONE, V. *et al.* Approaches to develop alternative testing strategies to inform human health risk assessment of nanomaterials. **Risk Anal.**, v. 36, p. 1538-1550, 2016.

SUN, S. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. **Science**, v. 80, n. 287, p. 1989-1992, 2000.

SUNA, T. *et al.* Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 372-381, 2006.

THOMAS, S., *et al.* Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. **Curr. Pharm. Des.**, v. 21, p. 6165-6188, 2015.

THOMASSEN, L.C., *et al.* Investigation of the cytotoxicity of nanozeolites A and Y. **Nanotoxicology**, v. 6, p. 472-485, 2012.

UNITED NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. 2011. New York and Geneva. 4 ed, p. 3. Disponível em: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf. Acesso em: 06 maio 2020.

VALLHOV, H. *et al.* The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. **Nano Lett**, v. 6, n. 8, p. 1682-1686, 2006.

VAN HOOK, A. Crystallization: Theory and Practice. **American Chemical Society Monograph**, n.152, 1961.

VANCE, M. E. *et al.* Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein J. Nanotechnol.**, v. 6, p. 1769-1780, 2015.

WALTERS, C.; POOL, E.; SOMERSET, V. Nanotoxicology: a review. *In*: SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. **Toxicology**: new aspects to this scientific conundrum. Rijeka: Intech Open, 2016. p. 45-63.

WARHEIT, B.D. *et al.* Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. **Pharmacology & Therapeutics**, v.120, p. 35-42, 2008.

WARHEIT, B.D. *et al.* Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. **ToxicolSci**, v.95, p. 270-280, 2007.

WARHEIT, D. B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? **ToxicolSci**, n.101, p. 183-185, 2008.

WEAVER, J. L. *et al.* Evaluation of a lymph node proliferation assay for its ability to detect pharmaceuticals with potential to cause immune-mediated drug reactions. **J. Immunotoxicol.** v. 2, p. 11-20, 2005.

WILLIAMS, K.L. **Endotoxins**: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation. New York: Informa Healthcare, 2007. 440p.

XIE, G; LU, W; LU, D. Penetration of titanium dioxide nanoparticles through slightly damaged skin in vitro and in vivo. **J ApplBiomaterFunct Mater**, v. 13, n. 4, e356-e361, 2015.

YANG, H., *et al.* Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 69-78, 2009.

YILDIRIMER, L. *et al.* Toxicology and clinical potential of nanoparticles. **Nano today**, v. 6, n. 6, p.585-607, 2011.

ZHAO, Y; WOEL, K N. Nanotoxicology in the Skin: How Deep is the Issue? **School of Materials Science & Engineering -Nano LIFE**, v. 4, n. 1, p. 1440004, 2014.

ZOU, J. *et al.* Toxicity of silver nanoparticle in rat ear and BALB/c 3T3 cell line. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 52, p. 1-10, 2014.