

**Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem  
substância ativa em função da sua densidade populacional**

**Ângela Daniela Alves da Costa**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Dezembro de 2013



**Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem  
substância ativa em função da sua densidade populacional**

**Ângela Daniela Alves da Costa**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

**Marize Campos Valadares**

**Eliana Martins Lima**

**Joana Andréa Soares Amaral**

Este trabalho teve a cooperação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular e de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.



Dezembro de 2013



## Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento é dirigido aos meus pais, irmã, cunhado e sobrinha que sempre estiveram presentes, que me ajudaram e me apoiaram de forma incondicional nesta fase especial da minha vida, pela força e pelo carinho. Sem vocês eu não teria chegado a onde cheguei e nem seria quem sou.

À professora Eliana Martins Lima e à professora Marize Campos Valadares do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos e Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – FarmaTec, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás pela bela recepção, pelo tempo disponibilizado, pela dedicação, pelos ensinamentos concedidos ao longo dos cinco meses, pela amizade e respeito. Muito obrigada!

À professora Joana Amaral pela orientação concedida, pela forma amigável com que sempre se dispôs a discutir os assuntos relacionados com a tese, pelo apoio incondicional durante esta jornada e pela confiança depositada em mim. Muito obrigada!

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular e de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás pelo apoio, pela amizade demonstrada, pelo companheirismo durante os cinco meses no Brasil, pelos ensinamentos demonstrados, por todo o auxílio técnico. Com vocês aprendi muito e serei eternamente grata.

Aos meus amigos que estiveram comigo ao longo desta jornada um muito obrigado pela paciência demonstrada, pelo carinho, pela amizade, pelo apoio e pelo incentivo sempre com uma palavra amiga.

Por fim, ao meu namorado e amigo Jorge Delgado por todo o incentivo e força, por me ouvir e aconselhar ao longo deste percurso, por muitas vezes acreditar em mim mais que eu mesma, pelo companheirismo demonstrado, pela grande paciência e pela presença em todos os momentos bons e menos bons desta caminhada.



## Resumo

A par da evolução da nanotecnologia verificada nas últimas décadas, assiste-se atualmente a uma crescente preocupação sobre eventuais riscos/toxicidade que os nanotransportadores possam representar. Uma vez que os estudos que visam avaliar a possível citotoxicidade *in vitro* dos nanotransportadores sem substância ativa são escassos, a realização de estudos científicos a esse respeito contribuirá certamente para uma melhor compreensão do tema.

O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade populacional, tendo sido testados quatro nanotransportadores distintos: nanocápsulas, nanoesferas, transportadores lipídicos nanoestruturados e lipossomas, com oito densidades populacionais (diluições decimais de  $2,10 \times 10^{12}$  a  $2,10 \times 10^5$  partículas/mL). A avaliação da citotoxicidade realizou-se numa cultura primária (linfócitos) pelo teste do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e numa linha celular (fibroblastos 3T3) pelo teste do corante vermelho neutro.

À exceção dos lipossomas, para os quais não foi evidenciada citotoxicidade para as concentrações testadas, verificou-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular dos linfócitos quando expostos às duas concentrações mais elevadas de nanotransportadores, tendo a menor percentagem de viabilidade celular sido obtida para o caso dos transportadores lipídicos nanoestruturados (69,2%). Para a concentração mais elevada de cada um dos nanotransportadores, a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 apresentou um decréscimo considerável quando comparada com o controlo, obtendo-se valores de  $IC_{50}$  de  $1,12 \times 10^{11}$  part/mL para as nanocápsulas,  $4,13 \times 10^{11}$  part/mL para as nanoesferas e  $1,59 \times 10^{10}$  part/mL para os transportadores lipídicos nanoestruturados.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, Fibroblastos 3T3,  $IC_{50}$ , Linfócitos humanos, Nanotransportadores sem substância ativa.



## Abstract

Alongside the development of nanotechnology, currently there has been a growing concern regarding the possible risks/toxicity that nanocarriers may represent. Considering the scarcity of studies conducted so far to evaluate the possible in vitro cytotoxicity of nanocarriers without active substance, all scientific studies carried out on this subject can certainly contribute to better understanding of the theme.

The objective of this study was to assess the cytotoxicity of nanocarriers prepared without active substance depending on its population density. For that purpose, four different nanoparticles: nanocapsules, nanospheres, liposomes and nanostructured lipid carriers with eight concentrations (decimal dilutions from  $2.10 \times 10^{12}$  to  $2.10 \times 10^5$  particles/mL) having been tested. The cytotoxicity evaluation was performed by using primary culture cells (lymphocytes) with the test of bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-ilo)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and a cell line (3T3 fibroblasts) with the test of neutral red dye.

With the exception of liposomes, for which no cytotoxicity was observed at the concentrations tested, there was a slight decrease in cell viability of the lymphocytes when exposed to the two highest concentrations of the nanocarriers, with the lowest percentage of cell viability being obtained for the nanostructured lipid carriers (69.2%). For the highest concentration of each nanocarrier, cell viability of 3T3 fibroblasts showed a considerable decrease when compared to control, resulting in  $IC_{50}$  values of  $1.12 \times 10^{11}$  part/mL for the nanocapsules,  $4.13 \times 10^{11}$  part/mL for nanospheres and  $1.59 \times 10^{10}$  part/mL for the nanostructured lipid carriers.

**Keywords:** Cytotoxicity, 3T3 fibroblasts,  $IC_{50}$ , Human lymphocytes, Nanocarriers without active substance



# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Índice.....	ix
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas .....	xvii
PRIMEIRO CAPÍTULO .....	1
Motivação, Objetivos e Organização da Dissertação.....	1
SEGUNDO CAPÍTULO .....	3
Introdução Teórica .....	3
2.1. Nanotransportadores.....	4
2.1.1 Nanopartículas poliméricas .....	7
2.1.2 Transportadores lipídicos nanoestruturados .....	8
2.1.3 Lipossomas .....	9
2.2. Cultura celular .....	11
2.2.1. Meios de cultura .....	12
2.2.2. Tipos de culturas celulares.....	13
2.2.3. Morfologia das culturas celulares .....	17
2.2.4 Contaminação de uma cultura celular .....	18
2.3. Citotoxicidade .....	19
2.3.1. Teste do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	20
2.3.2 Teste de incorporação do corante vermelho neutro.....	21
TERCEIRO CAPÍTULO .....	23
Material e Métodos .....	23
	ix

3.1 Material .....	23
3.1.1 Soluções / Reagentes .....	23
3.1.2 Equipamentos .....	26
3.2. Nanotransportadores sem substância ativa (brancos).....	26
3.3. Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores numa cultura primária de linfócitos humanos .....	28
3.3.1 Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores pelo método MTT .....	32
3.4. Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores numa Linha de fibroblastos BALB/c 3T3-A31 .....	34
3.4.1. Exposição das células BALB/c 3T3-A31 aos nanotransportadores ....	35
3.4.2 Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores pelo teste de captação do corante vermelho neutro.....	37
3.5 Análise da morfologia celular .....	38
3.5.1 Morfologia celular com corante Instant Prov em células BALB/c 3T3-A31 .....	39
QUARTO CAPÍTULO .....	43
Resultados e Discussão .....	43
4.1 Caracterização dos nanotransportadores .....	43
4.2 Avaliação da citotoxicidade em linfócitos segundo o método de MTT.....	48
4.3 Avaliação da citotoxicidade em células de fibroblastos 3T3 segundo o teste do corante vermelho neutro .....	57
4.4 Morfologia celular .....	63
QUINTO CAPÍTULO.....	69
Conclusões e Trabalhos Futuros .....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática de diferentes tipos de nanotransportadores. ....	5
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática de uma nanocápsula e de uma nanoesfera polimérica. ....	7
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática de um transportador lipídico nanoestruturado, onde se pode visualizar a matriz composta por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos representados por figuras geométricas brancas. ....	9
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática de um lipossoma a) do tipo multilamelar e b) do tipo unilamelar. ....	10
<b>Figura 5:</b> Imagem de células de linfócitos humanos indicadas pelas setas pretas. ....	15
<b>Figura 6:</b> Imagem de células de fibroblastos 3T3 observados ao microscópio invertido com uma objetiva de 20×. ....	17
<b>Figura 7:</b> Placa de 12 poços, em que os poços com coloração amarela estão contaminados com bactérias e/ou fungos. ....	19
<b>Figura 8:</b> Imagem dos nanotransportadores: a) Transportadores lipídicos nanoestruturados, b) Nanoesferas, c) Nanocápsulas, d) Lipossomas. ....	27
<b>Figura 9:</b> Tubos de falcon contendo Histopaque® - 1077 em contacto com a solução de sangue. ....	29
<b>Figura 10:</b> Diferentes fases após a centrifugação. ....	30
<b>Figura 11:</b> Frascos de cultura celular contendo cada um 2 mL de SFB, 1 mL de fitohemaglutinina PHA-M, 17 mL de meio RPMI 1640 e 500 µL da solução celular. .	30
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática das diluições dos nanotransportadores. .	31
<b>Figura 13:</b> Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a cor-de-laranja correspondem a ensaios em branco (apenas contêm meio RPMI), os poços a cor-de-rosa são os poços de controlo (células expostas somente a meio RPMI), os poços a verde contêm a amostra e meio RPMI e os poços a roxo correspondem aos poços contendo 8 concentrações da amostra e células. A placa foi dividida, sendo avaliadas duas amostras. ....	32

<b>Figura 14:</b> Representação esquemática dos procedimentos para avaliação da citotoxicidade dos nanotransportadores em linfócitos humanos. ....	33
<b>Figura 15:</b> Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a vermelho contêm 100 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços representados a azul contêm 100 µL da suspensão celular. ....	35
<b>Figura 16:</b> Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a vermelho contêm 100 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços representados a verde contêm 90 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 10 µL de cada concentração a ser avaliada. ....	36
<b>Figura 17:</b> Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a vermelho correspondem a ensaios em branco (apenas contêm meio DMEM), os poços representados a castanho correspondem aos poços de controlo (células expostas somente ao meio DMEM), os poços representados a amarelo correspondem aos poços das 8 concentrações de nanotransportadores testadas e os poços representados a cinzento contêm nanotransportadores e o meio DMEM. ....	37
<b>Figura 18:</b> Representação esquemática dos procedimentos para avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores em fibroblastos 3T3 – A31. ....	38
<b>Figura 19:</b> Esquema da placa de 12 poços, onde os poços representados a amarelo contêm 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços a castanho contêm 2 mL da suspensão celular. ....	39
<b>Figura 20:</b> Esquema da placa de 12 poços, onde os poços representados a amarelo contêm 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços a cinzento contem 1,8 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 200 µL de cada concentração de nanotransportadores em que NC1, NE 1 e NLC 1 correspondem à concentração mais elevada ( $2,1 \times 10^{12}$ part/mL) e NC 2, NE 2 e NLC 2 à concentração seguinte ( $2,1 \times 10^{11}$ part/mL). ....	40
<b>Figura 21:</b> Esquema da placa de 12 poços, onde os poços representados a amarelo são os ensaios a branco (apenas contêm meio DMEM), a preto são os poços de controlo (células expostas somente ao meio DMEM) e a roxo são os poços das duas maiores concentrações dos três nanotransportadores (NC, NE e NLC). ....	40

<b>Figura 22:</b> Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição às nanoesferas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.....	49
<b>Figura 23:</b> Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição às nanocápsulas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.....	51
<b>Figura 24:</b> Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição aos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.....	52
<b>Figura 25:</b> Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição aos lipossomas brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.....	53
<b>Figura 26:</b> Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição aos diferentes nanotransportadores brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.....	54
<b>Figura 27:</b> Viabilidade celular em fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de exposição às nanoesferas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método do corante vermelho neutro.....	59
<b>Figura 28:</b> Viabilidade celular em fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de exposição às nanocápsulas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método do corante vermelho neutro.....	60
<b>Figura 29:</b> Viabilidade celular em fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de exposição aos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método do corante vermelho neutro.....	61
<b>Figura 30:</b> Viabilidade celular em fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição aos nanotransportadores brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método corante vermelho neutro.....	62
<b>Figura 31:</b> Morfologia dos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observado com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de $2,1 \times 10^{11}$ part/mL de NE observada com uma objetiva de 40×, (c) à densidade de $2,1 \times 10^{10}$ part/mL de NE observada com uma objetiva de 20×.....	64

**Figura 32:** Incorporação do corante Instant Prov nas células dos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NE observada com uma objetiva de 20×, (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NE observada com uma objetiva de 20×..... 65

**Figura 33:** Morfologia das células fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20×, (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20×..... 66

**Figura 34:** Incorporação do corante Instant Prov nas células dos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20×, (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20×..... 67

**Figura 35:** Morfologia das células fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NLC observada com uma objetiva de 40×, (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NLC observada com uma objetiva de 20×..... 68

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de trabalhos relativos à avaliação de citotoxicidade de nanotransportadores utilizados como veículos de fármacos.....	6
<b>Tabela 2:</b> Principais propriedades (diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta) dos nanotransportadores em estudo. ....	45
<b>Tabela 3:</b> Valores de pH de soluções dos nanotransportadores em estudo com concentrações de $2,1 \times 10^{12}$ e $2,1 \times 10^{11}$ part/mL ao longo de dois dias para os dois tipos de células utilizadas. ....	47
<b>Tabela 4:</b> Classificação de citotoxicidade consoante a percentagem de viabilidade celular. ....	49



## Lista de Abreviaturas

BALB/c 3T3-A31	Linha celular 3T3-A31 obtida de murganhos da linha BALB/c
CMN	Células mononucleares
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECVAM	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória para 50% da população testada
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
LD <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população testada
LDH	Lactato desidrogenase
LIP	Lipossomas
MTT	Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
NICEATM	<i>Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods</i>
NLC	Transportadores lipídicos nanoestruturados
NR	Corante vermelho neutro – <i>Neutral Red</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>

NTP	<i>National Toxicology Program</i>
PBS	Tampão fosfato salina
Pdi	Índice de polidispersão
PLA	Ácido poli-lático
PLGA	Ácido poli-lático-co-glicólico
RPMI 1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
Tripsina/EDTA	<i>Solução</i> de tripsina e ácido etileno-diaminotetarcético
UFG	Universidade Federal de Goiás

## **PRIMEIRO CAPÍTULO**

### **Motivação, Objetivos e Organização da Dissertação**

Decorrente da exigência do plano de estudos do Mestrado em Tecnologia Biomédica do Instituto Politécnico de Bragança, mas também devido ao interesse pessoal no tema, com o acréscimo do conhecimento prático que daí advinha, surgiu a presente dissertação. O trabalho realizado dividiu-se em duas etapas principais: a primeira correspondeu à parte prática realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular e de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos – FarmaTec, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil, tendo o estágio sido financiado pelo programa de Intercambio com uma duração de 5 meses; a segunda etapa, que decorreu no Instituto Politécnico de Bragança, correspondeu à elaboração do trabalho escrito e respetiva apresentação.

Nas últimas décadas tem-se assistido a uma grande evolução da nanotecnologia e suas aplicações em diversas áreas. Na indústria farmacêutica em particular, o desenvolvimento de nanotransportadores, isto é, sistemas à nanoescala que possam libertar de forma controlada/transportar substâncias a regiões específicas do organismo, continua a ser um tema de grande importância que, como tal, tem sido alvo de realização de diversos estudos. Apesar das inúmeras vantagens associadas à utilização de nanotransportadores, assiste-se igualmente a uma crescente preocupação sobre eventuais riscos/toxicidade que os nanotransportadores possam representar, uma vez que devido ao seu reduzido tamanho estes podem apresentar propriedades diferentes das de materiais idênticos, mas de maior dimensão. São já vários os estudos realizados até à presente data relativos à avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanotransportadores. Contudo, a maioria incide essencialmente na avaliação da citotoxicidade do fármaco comparativamente com a citotoxicidade do nanotransportador com o fármaco, sendo escassos os estudos publicados que incidem na avaliação da citotoxicidade que o próprio nanotransportador sem substância ativa pode provocar nas células.

## *Motivação, Objetivos e Organização Dissertação*

Importa assim desenvolver trabalhos de investigação que visem aprofundar o conhecimento sobre esta temática já que são escassos os estudos científicos que a analisam.

A pertinência deste estudo reside nos resultados que irá fornecer que podem levar a uma melhor compreensão do tema e ser um meio condutor e facilitador de futuras investigações.

Assim, os objetivos desta dissertação consistem na avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem substância ativa, nomeadamente nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados, em função da sua densidade populacional em dois tipos de células, linfócitos humanos e fibroblastos 3T3.

Esta dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos, os quais se enumeram seguidamente para uma melhor perceção dos assuntos que vão ser abordados ao longo da mesma. No presente capítulo, apresenta-se a motivação, os objetivos fundamentais e uma breve abordagem à disposição do trabalho.

No segundo capítulo, expõe-se a introdução teórica onde se aborda a temática da utilização de nanotransportadores, culturas celulares e métodos de avaliação de citotoxicidade.

No terceiro capítulo, apresenta-se os equipamentos e os materiais usados ao longo de toda a atividade laboratorial realizada. Seguidamente, no quarto capítulo, são expostos os resultados obtidos e realizada a discussão dos mesmos.

No quinto capítulo, será apresentada a conclusão e referidas algumas sugestões para trabalhos futuros.

Por último, no final do trabalho, apresentam-se as referências bibliográficas utilizadas e que permitiram adquirir conhecimentos essenciais para a execução desta dissertação.

## **SEGUNDO CAPÍTULO**

### **Introdução Teórica**

A nanotecnologia é atualmente considerada como uma ciência emergente e um fenómeno global sendo expectável que contribua de forma significativa para a evolução tecnológica do século XXI. Esta expectativa deve-se sobretudo à intensa investigação que tem sido realizada nesta área e às descobertas feitas por diversas equipas em todo o mundo (Fatal & Eugénio, 2010).

De uma forma sintética, o termo nanotecnologia corresponde à área do conhecimento que estuda a manipulação da matéria à escala nanométrica. O primeiro registo sobre o tema, mesmo sem o uso do termo *nanotecnologia*, aconteceu em 1959 numa palestra realizada pelo físico norte-americano Richard Feynman. O uso do termo *nanotecnologia* surgiu apenas em 1976, utilizado por Norio Taniguchi (Silva, 2011). Desde essa data até aos dias de hoje, a nanotecnologia teve uma evolução rápida e abrangente, verificando-se um interesse crescente em torno desta temática, possivelmente devido ao seu potencial em revolucionar campos tão diversos como a engenharia ou a medicina. De facto, sendo transversal a diversos domínios científicos, a nanotecnologia possui várias aplicações nas mais diversas áreas, entre as quais se salienta a medicina e a farmacêutica. Atualmente tem-se assistido a um enorme aumento do número de trabalhos de pesquisa com vista ao desenvolvimento de potenciais aplicações da nanotecnologia na medicina, incluindo a exploração de nanomateriais na libertação e vectorização de fármacos (Couvreur, 2002).

Na indústria farmacêutica em particular, o desenvolvimento de agentes terapêuticos que consigam libertar substâncias ativas de forma controlada e que possam alcançar de forma seletiva áreas específicas do corpo humano, permitindo assim maximizar o efeito terapêutico e minimizar efeitos adversos, continua a ser um objetivo importante que, como tal, tem merecido especial atenção (Couvreur, 2002).

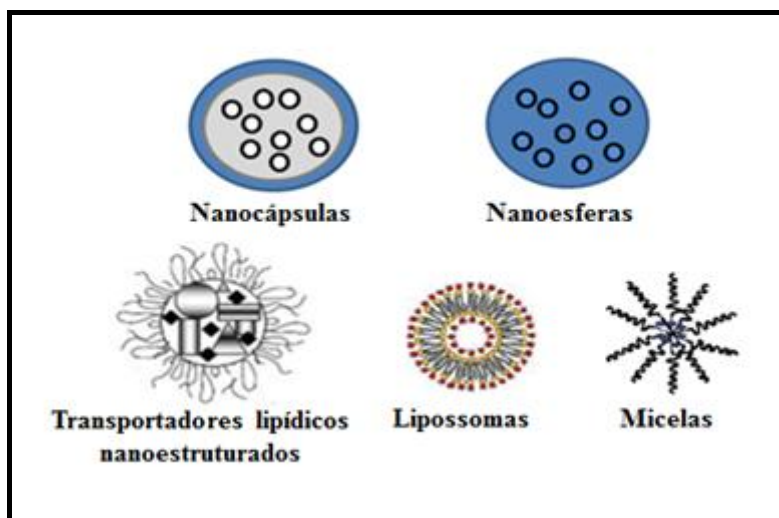
Os nanotransportadores foram inicialmente desenvolvidos entre a década de sessenta e setenta e desde então a sua utilização tem sido frequentemente proposta na medicina/farmacêutica como sistemas de libertação controlada de fármacos (Ravi,

2000). Como referido, o interesse atual nestes sistemas deve-se principalmente à necessidade de libertação do fármaco de forma controlada em zonas específicas do organismo. De uma forma geral, os nanotransportadores são considerados como excelentes veículos para o transporte e libertação de substâncias ativas pelas vantagens que oferecem, tais como a capacidade de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica (Couvreur, 2002), uma maior eficiência terapêutica (alcançada pela libertação controlada), a possibilidade de direcionamento a alvos específicos e a diminuição de toxicidade de fármacos, entre outras (Rawat, 2006). Embora as propriedades inovadoras dos nanotransportadores sejam de uma forma geral consideradas vantajosas, não se pode deixar de ponderar alguns eventuais inconvenientes, em particular o receio em relação à sua eventual toxicidade (Stem & McNeil, 2008). Devido à reduzida dimensão dos nanomateriais em geral (que por definição apresentam dimensões de  $\leq 100$  nm), as suas propriedades podem diferir substancialmente das apresentadas por materiais de maior dimensão com a mesma composição, podendo conduzir a interações danosas em sistemas biológicas, com potencial de gerar toxicidade. De facto, alguns estudos sugerem que os nanomateriais não são inerentemente benignos e que podem afetar de forma prejudicial os sistemas biológicos a nível celular e subcelular (circulando pelo organismo, atravessando membranas celulares, atingindo organelos como as mitocôndrias, etc.) (Nel et al., 2006). Por este motivo e atendendo ao potencial uso de nanotransportadores como veículo para a administração de fármacos, torna-se necessária a realização de estudos no sentido de verificar a biocompatibilidade de nanotransportadores com as células alvo e verificar a viabilidade celular quando estas são expostas aos nanotransportadores.

## **2.1. Nanotransportadores**

Os nanotransportadores têm sido definidos como sistemas desenvolvidos à nanoescala ( $< 1 \mu\text{m}$ ), podendo ser constituídos por diferentes materiais biodegradáveis como polímeros naturais ou sintéticos, lípidos (tais como fosfolípidos) e em alguns casos compostos organometálicos (Rawat, 2006). Existem vários tipos de nanotransportadores descritos na literatura, tais como nanocápsulas, nanoesferas, transportadores lipídicos nanoestruturados, micelas poliméricas, lipossomas, nanotubos

de carbono, entre outros (Shaffazick & Guterres, 2003; Stern & MaNeil, 2008). A Figura 1 representa alguns desses tipos de nanotransportadores.



**Figura 1:** Representação esquemática de diferentes tipos de nanotransportadores (Adaptado de Rawat et al., 2006; Teixeira, 2008).

Os nanotransportadores apresentam propriedades físico-químicas que os tornam extremamente atrativos para o uso nas mais variadas áreas, como na medicina (diagnóstico e tratamento de patologias), cosmética, cerâmica, entre outras (Hughes, 2005; Rawat et al., 2006). Como referido, no caso particular da sua utilização como sistemas de liberação controlada de fármacos, oferecem inúmeras vantagens tais como, maior eficiência terapêutica com a liberação gradual e controlada do fármaco, diminuição da toxicidade da substância ativa incorporada, maior tempo de permanência na circulação, maior estabilidade, natureza e composição dos nanotransportadores variada, administração segura e direcionamento a alvos específicos (Azevedo, 2002; Rawat et al., 2006).

Na Tabela 1 apresentam-se alguns exemplos de estudos realizados sobre diferentes tipos de nanotransportadores, referindo o fármaco, o tipo de células envolvidas e o tipo de teste de citotoxicidade utilizado.

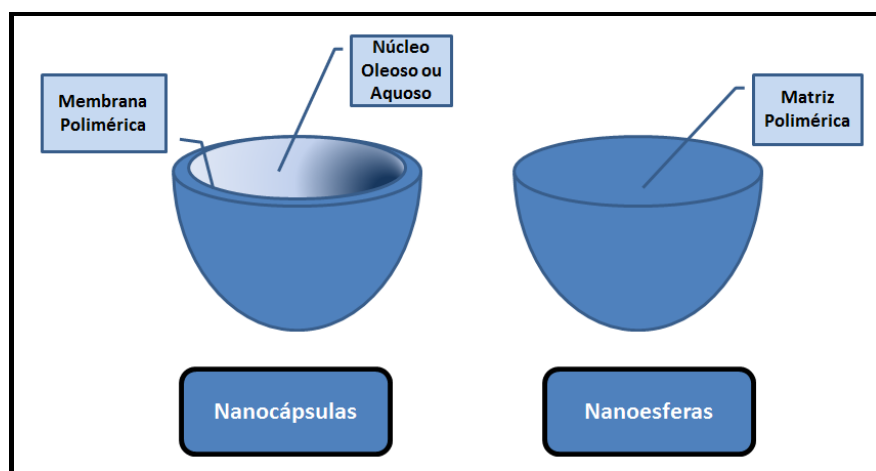
**Tabela 1:** Exemplos de trabalhos relativos à avaliação de citotoxicidade de nanotransportadores utilizados como veículos de fármacos.

<b>Nanotransportadores</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Tipo de célula</b>	<b>Teste de citotoxicidade</b>	<b>Referências</b>
Nanopartículas poliméricas de poli- $\epsilon$ -caprolactona	LMWH (Heparina de baixo peso molecular)	Linha celular de macrófagos NR8383	Azul de tripano / MTT	Eidi et al., 2010
Lipossoma	Lupeol	Células leucémicas K - 562	Azul de tripano	Santos et al., 2011
Nanopartículas poliméricas de poli- $\epsilon$ -caprolactona	Zinco(II)ftalocianina	Células de carcinoma de pulmão humano A549	MTT	Soares, 2009
Nanocápsulas	Isotretinoína	Células leucémicas K - 562	MTT	Diniz, 2008
Lipossomas	Antineoplásico	Linha tumoral A549	MTT	Takamoto et al., 2012
Nanoesferas de PLGA	Clorambucil	Células tumorais da mama MCF - 7 & Linha de fibroblastos NIH - 3T3	MTT	Dias, 2013
Nanocápsulas	Meloxicam	Células de esplenócitos	MTT	Nascimento et al., 2012
Nanopartículas de PLA	5-Fluorouracilo	Hep-2	MTT	Mattos, 2013
Nanocápsulas PLGA	Grandisina	Fibroblastos 3T3	NR	Stecanella et al., 2013
Lipossoma	Isotritinoína	K-562	Azul de tripano	Dinis et al., 2008

### 2.1.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais sólidos estáveis, sendo constituídas por materiais de natureza polimérica, biodegradáveis ou não, e apresentando um diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ . As nanopartículas são capazes de transportar substâncias ativas e controlar a libertação destas (Couvreur et al., 1995; Prata, 2011).

As nanopartículas são classificadas segundo duas categorias, nomeadamente em nanocápsulas ou nanoesferas. Estas diferenciam-se entre si pela sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso ou aquoso (Figura 2). As nanoesferas são sistemas matriciais, não apresentam óleo na sua composição e a substância ativa encontra-se dispersa fisicamente e uniformemente na matriz polimérica (Figura 2) (Soppimath et al., 2001; Couvreur et al., 2002; Schaffazick & Guterres, 2003; Kingsley et al., 2006; Prata, 2011).



**Figura 2:** Representação esquemática de uma nanocápsula e de uma nanoesfera polimérica.

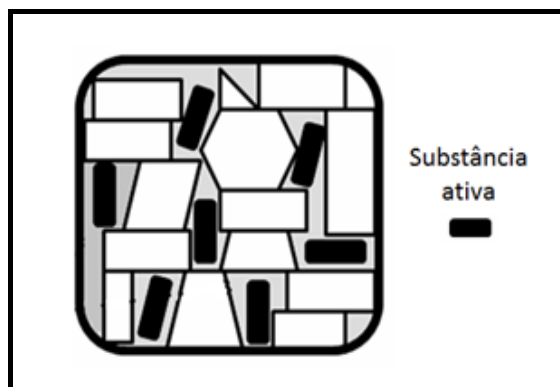
Existem diversos métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas na literatura. De uma forma geral existem dois grupos principais de métodos, os baseados na polimerização de monómeros ou baseados em polímeros pré-formados (Couvreur et al., 1995), sendo este último o mais frequente utilizado dado não requerer processos adicionais de purificação do material coloidal obtido. São vários os métodos baseados

na utilização de polímeros pré-formados tais como emulsificação/evaporização do solvente, nanoprecipitação, emulsificação/difusão do solvente, entre outros (Reis et al., 2006, Mora-Huertas et al., 2010). Neste estudo as nanocápsulas e nanoesferas utilizadas foram obtidas por nanoprecipitação. De uma forma geral, para a preparação de nanopartículas poliméricas necessita-se de um polímero, de um ou vários solventes, de um não-solvente, de um ou mais tensoativos e, se se tratar de nanocápsulas, de um óleo. Os polímeros pré-formados biodegradáveis mais usados na produção de nanopartículas poliméricas são os poliésteres de ácidos, como o ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) e o ácido poli-lático (PLA), a poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) entre outros (Domb et al., 2002; Prata, 2011).

### **2.1.2 Transportadores lipídicos nanoestruturados**

As nanopartículas lipídicas sólidas são constituídas por lípidos sólidos à temperatura ambiente e corporal, e tensoativos. Estas possuem várias desvantagens como a baixa capacidade de encapsulamento e o estado polimórfico da matriz lipídica. Para melhorar a eficiência de encapsulamento do referido tipo de partículas, surgiu, no final dos anos 90, a segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas designadas de transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC). Estes apresentam uma matriz constituída por uma mistura de lípidos líquidos (óleo) e lípidos sólidos à temperatura ambiente. O resultado final traduz-se numa matriz menos ordenada que apresenta muitas imperfeições, permitindo acomodar uma maior quantidade de substâncias ativas (Figura 3) (Venkata & Omathano, 2009; Guimarães, 2011; Muller et al., 2011; Severino et al., 2011). Os lípidos usados para a formulação dos transportadores lipídicos nanoestruturados são escolhidos de modo a obter características químicas e físicas adequadas. Os lípidos líquidos usados normalmente na composição dos NLC são os triacilglicerois de cadeia longa e os ácidos gordos. Entre os lípidos sólidos mais frequentes utilizados encontra-se o monoestearato de glicerilo, o ácido esteárico e o palmitoesterato de glicerilo (Tamjidi et al., 2013).

Os transportadores lipídicos nanoestruturados podem ser administrados por várias vias como oral, parenteral, oftálmica e dérmica (Macato, 2009).



**Figura 3:** Representação esquemática de um transportador lipídico nanoestruturado, onde se pode visualizar a matriz composta por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos representados por figuras geométricas brancas (Adaptado de Guimarães, 2011).

### **2.1.3 Lipossomas**

Os lipossomas surgiram na década de 70, quando o investigador Alex Bangham realizou uma experiência laboratorial e constatou que a hidratação de um filme lipídico formado por fosfolípidos levava à formação de vesículas fechadas com estrutura idêntica à encontrada nas membranas celulares, tendo por esse motivo designado essas estruturas lipídicas de lipossomas (Batista et al., 2007; Venkata & Omathano, 2009).

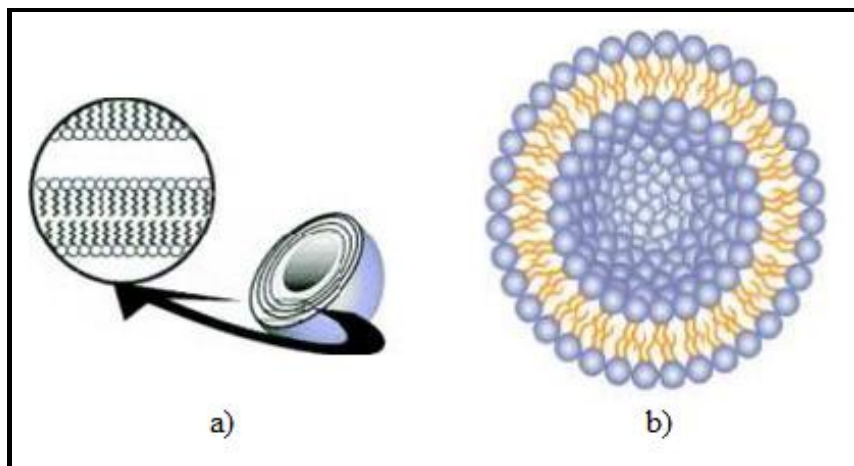
Os lipossomas são vesículas esféricas que possuem um tamanho micro ou nanométrico, constituídos por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um meio aquoso (Edwards & Baeumner, 2006; Batista et al., 2007; Araújo et al., 2009). Os lipossomas diferem entre si na dimensão, composição, na carga elétrica da superfície e estrutura, apresentando em comum o facto de serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade (Aoki et al., 1997).

Estes nanotransportadores podem apresentar uma única bicamada lipídica, adquirindo neste caso a designação de unilamelar (Figura 4, b)), ou podem apresentar múltiplas camadas, separadas por fases aquosas, em torno do compartimento aquoso interno, sendo designados por multilamelares (Figura 4, a)) (Batista et al., 2007).

Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas no seu compartimento aquoso interno e substâncias lipofílicas inseridas nas bicamadas das suas membranas

(Batista et al., 2007; Araujo et al., 2009). Assim, têm vindo a ser estudados para diferentes fins, entre os quais se inclui o transporte de fármacos, sendo várias as aplicações terapêuticas descritas para os lipossomas entre as quais se pode referir, o tratamento de diferentes tipos de cancro, o tratamento de patologias oftálmicas e dermatológicas, o desenvolvimento de vacinas, a sua aplicação em terapias de reposição hormonal, e em terapia genética, entre outras (Allen & Bloxham, 1989; Gregoriadis, 1995; Batista et al., 2007). Os lipossomas são considerados ótimos sistemas de libertação controlada de fármacos uma vez que apresentam uma baixa toxicidade, uma elevada biocompatibilidade, são biodegradáveis e conseguem libertar a substância ativa em células ou compartimentos celulares individuais (Aoki et al., 1997; Edwards & Baeumner, 2006).

Os lipossomas possuem frequentemente uma constituição muito simples, sendo constituídos por fosfolípidos de origem sintética ou natural, sendo que estes últimos aumentam a biocompatibilidade dos lipossomas. Os fosfolípidos mais usados são a fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina (Vemuri et al., 1995; Batista et al., 2007). Alguns lipossomas podem ainda incluir na sua composição compostos adicionais, tais como colesterol e antioxidantes.



**Figura 4:** Representação esquemática de um lipossoma a) do tipo multilamelar e b) do tipo unilamelar (Adaptado de Mihranyan et al., 2012).

## **2.2. Cultura celular**

As primeiras experiências de cultura de células foram realizadas por Ross G. Harrison há cerca de 100 anos atrás, na Universidade Johns Hopkins. No seu artigo, escrito em 1907, Harrison dizia que se houvesse precauções assépticas adequadas os tecidos sobreviviam por uma semana e, em alguns casos, sobreviviam durante aproximadamente quatro semanas. A partir desta data, deu-se início à utilização da cultura de células *in vitro*, permitindo assim estudar o crescimento, a diferenciação e a morte celular (Cruz et al., 2009; Oliveira, 2009).

Desde essa altura, a cultura de células tem vindo a afirmar-se como uma ferramenta muito útil e importante na realização de testes de citotoxicidade aquando da investigação e desenvolvimento de novos fármacos, no ramo da engenharia genética, da medicina, entre outros (Ryan, 2008; Cruz et al., 2009). Esta técnica é largamente reconhecida e diariamente usada em laboratórios, principalmente em investigação.

O processo de extração de células animais ou vegetais de tecidos vivos, com consequente colocação num ambiente com nutrientes e todos os fatores necessários à sua sobrevivência, crescimento e proliferação, designa-se por cultura celular. Este processo realiza-se em laboratório em condições controladas de temperatura, humidade, oxigénio e dióxido de carbono. As células em cultura são capazes de crescer e dividir-se normalmente *in vitro*, de forma similar quando crescem *in vivo* se os nutrientes necessários forem fornecidos através do meio de cultura (Hartung, 2002; Ryan, 2008; Freshney, 2010).

A cultura de célula permite assim o isolamento de uma população de células puras, o crescimento/propagação de tecidos, a análise de possíveis mecanismos envolvidos nos processos patológicos e o estudo da fisiologia de um único tipo de células sem efeitos de encobrimento de outro tipo de células (Boulton, 1990).

São diversas as vantagens de se utilizarem culturas celulares, entre as quais o controlo das condições ambientais, análise independente de critérios, a realização de um elevado número de testes num pequeno intervalo de tempo e a redução dos ensaios com animais. Contudo, existem também desvantagens tais como a perda de características fenotípicas e utilização de um sistema biológico fora do ambiente natural (Tavares & Tavares, 2009).

A cultura de células tem vindo a ser usada em diversos estudos de biologia celular e molecular (melhorando a compreensão da regulação e fisiologia da célula), em estudos de células tumorais, no desenvolvimento de fármacos, terapia genética, entre outros. Servem ainda de excelentes modelos para estudar a resposta das células a drogas, a efeitos de genotoxicidade e a compostos tóxicos (Ryan, 2008). Recentemente, a determinação da citotoxicidade basal *in vitro*, utilizando culturas celulares, tem sido utilizada como adjuvante de testes animais, auxiliando na seleção das doses iniciais, o que por sua vez permite reduzir o número de animais utilizados em ensaios de avaliação de toxicidade aguda sistémica (Valadares, 2006).

### **2.2.1. Meios de cultura**

O meio de cultura é considerado um dos componentes mais importantes para uma cultura *in vitro* (Freshney, 2010). Dependendo do tipo de célula que se cultiva, as condições de cultura variam. O meio de cultura celular é um líquido, que consiste numa solução base definida, onde as células crescem e se multiplicam, que dependendo das necessidades de cada célula, pode ser constituído por sais inorgânicos (mantém o equilíbrio osmótico entre as células), açúcares (maior fonte de energia das células), aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, antibióticos, soro, entre outros (Hartung, 2002). Sendo assim, o meio de cultura celular fornece compostos necessários para as células, tais como hormonas, nutrientes necessários e fatores de crescimento e permite ajustar a pressão osmótica e o pH das células. O meio de cultura deve ser trocado quando apresenta uma cor amarela (meio ácido) ou púrpura (meio alcalino).

Para se alcançar um meio de cultura celular ideal, deve-se ter em atenção a temperatura, o substrato para adesão da camada de células, os fatores de crescimento, o fornecimento de gases essenciais e o meio de cultura (Ryan, 2008). Quando as condições do meio de cultura se encontram ideais, as células podem apresentar funções fisiológicas e bioquímicas similares às apresentadas *in vivo* como contração muscular ou secreção de enzimas ou hormonas (Ryan, 2008).

A temperatura do meio é colocada a valores similares à temperatura corporal do dador de onde foram retiradas as células, sendo frequente utilizar temperaturas em torno

de 37°C uma vez que os mamíferos apresentam uma temperatura entre os 36 e 37°C (Tavares & Tavares, 2009).

Uma cultura celular para proliferar exige um ambiente estritamente controlado. Sendo assim, a incubação da cultura proporciona o ambiente e as condições apropriadas ao crescimento das células. A utilização de estufas de CO<sub>2</sub> permite a circulação de ar e mantém uma atmosfera apropriada e controlada quanto à temperatura, à humidade e à composição da fase gasosa (Cruz et al., 2009; Freshney, 2010).

Os substratos usados como suporte de uma cultura de células têm a capacidade de fornecer suporte e crescimento às células. Os substratos mais usados são os vidros e alguns plásticos tratados (Tavares & Tavares, 2009).

O soro é um dos mais importantes componentes das culturas celulares pois funciona como uma fonte de vitaminas e hormonas, fatores e inibidores de crescimento, promovendo assim a proliferação celular, apresentando adicionalmente outras importantes características tais como a sua atividade anti-tripsina (Tavares & Tavares, 2009). O uso de soro no meio da cultura celular pode trazer algumas desvantagens como a frequente variabilidade e estimulação ou inibição do crescimento. Existem diversos soros que são utilizados para as culturas celulares, como os soros de origem de cavalo, bovino e humano, sendo o mais utilizado o soro fetal bovino. Este soro permite que as células em cultura sobrevivam e se reproduzam. As suas principais funções é a proteção mecânica, capacidade tampão em culturas com taxas de proliferação reduzidas e ligação e neutralização de toxinas (Tavares & Tavares, 2009; Pinto, 2011).

### **2.2.2. Tipos de culturas celulares**

De uma forma genérica, para se criar uma cultura de células *in vitro*, necessita-se de um doador, de células ou de tecidos, e de um meio de cultura adequado (Hartung, 2002). As características apresentadas pelas culturas celulares resultam da relação entre a origem e a forma de adaptação destas às condições de cultura celular (Ryan, 2008).

Existem dois grandes grupos de culturas celulares: as culturas primárias e as linhas celulares.

As culturas primárias são obtidas diretamente dos tecidos vegetais ou animais. Estas culturas são heterogéneas, apresentando assim diferentes populações celulares e diferentes estados de diferenciação celular, ou seja, cada amostra retirada do dador é única e impossível de ser reproduzida exatamente. O processo de diferenciação para este tipo de células começa no momento em que são removidas do doador, pois estas culturas são dinâmicas e estão em constante alteração. Sendo assim, as culturas primárias são bastante complicadas, exigindo meios de cultura complexos sendo sistemas extremamente difíceis de padronizar, mantendo-se pouco tempo em cultura, possuindo uma capacidade limitada de se multiplicarem e sendo favoráveis ao desenvolvimento de contaminações (Hartung, 2002; Ryan, 2008).

As linhas celulares podem ser obtidas a partir da manutenção das culturas primárias. Estas podem ser células imortalizadas, devido a alterações genéticas, possuem um crescimento rápido e contínuo, são constituídas por um único tipo de células que se propaga de forma limitada de divisões celulares, e em alguns casos propaga-se de forma ilimitada, sendo mais estáveis, permitindo uma maior reprodutividade em relação às células primárias. Isto deve-se ao facto de ocorrerem alterações no fenótipo das células, logo após o isolamento do tecido do dador (Hartung, 2002; Ryan, 2008).

Sendo assim, a partir de uma cultura bastante heterogénea (cultura primária), contendo diversos tipos de células do tecido original, pode-se obter uma linha de células mais homogénea. Esta linha obtém-se por subcultura de uma cultura primária na qual é necessário renovar periodicamente o meio de cultura (Cruz et al, 2009).

Neste trabalho utilizou-se uma cultura primária, nomeadamente de linfócitos humanos, e uma linha celular, de fibroblastos de murganho (camundongo) BALB/c 3T3-A31.

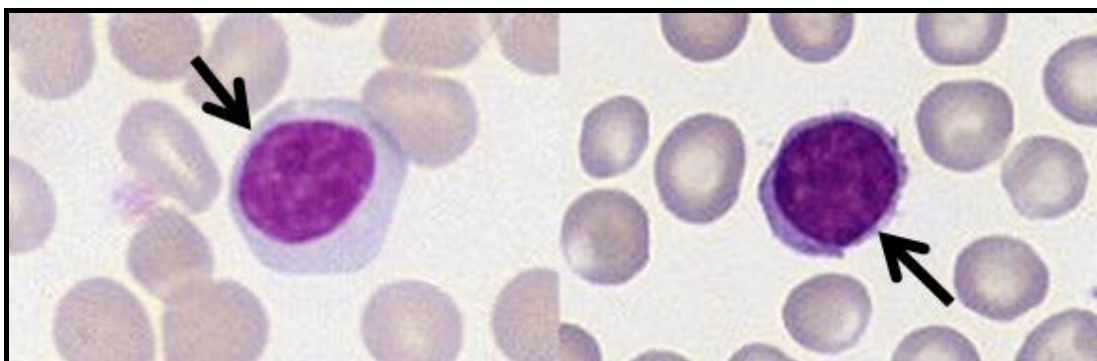
### ***Linfócitos humanos***

Os linfócitos são um tipo de glóbulos brancos presentes no sangue humano representando o segundo grupo mais abundante (cerca de 30%) dos referidos glóbulos em circulação. A maioria destas células encontra-se no tecido linfoide. Apresentam um núcleo arredondado, com um formato esférico e possuem um diâmetro entre 6 e 18  $\mu\text{m}$

(Figura 5). São os glóbulos brancos que apresentam menores dimensões e com um citoplasma muito reduzido e sem grânulos. A sua principal função é participar na defesa do corpo contra agentes infecciosos, como vírus, bactérias, entre outros (Hoffbrand et al., 2013).

Os linfócitos dividem-se em linfócitos B, células NK e linfócitos T. Os linfócitos B (cerca de 15% dos linfócitos) são especializados na produção de anticorpos. Estes reconhecem e combatem os microrganismos e substâncias estranhas que penetram no corpo. Os linfócitos T (constituem aproximadamente 75% dos linfócitos) podem ser auxiliares e citotóxicos. Os auxiliares estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos e os citotóxicos a atacar e destruir células anormais. Em conjunto, os linfócitos B e T são os responsáveis pela imunidade (Hoffbrand et al., 2013).

Os linfócitos encontram-se normalmente no estado quiescente (repouso) mas na presença de antigénios (partícula ou molécula capaz de iniciar uma resposta imune) são ativados e proliferam rapidamente. Os linfócitos T, quando ativados, proliferam e podem vir a secretar mediadores químicos para outras células ou funcionar como auxiliares ativando os macrófagos e outros linfócitos. Esses linfócitos proliferam *in vitro* quando estimulados por mitógenos (substância que estimula a proliferação celular/mitoses) como a fitohemaglutinina ou a concanavalina. Os linfócitos B quando ativados são designados de plasmócitos e são capazes de proliferar e secretar anticorpos contra antigénios invasores. Estes linfócitos *in vitro* proliferam em resposta a lipopolissacarídeos (Calder, 1998).



**Figura 5:** Imagem de células de linfócitos humanos indicadas pelas setas pretas (Adaptado de Hoffbrand et al., 2013).

Os linfócitos foram escolhidos para o presente estudo por se tratar de uma cultura primária, pela sua facilidade de obtenção e também em virtude da sua importância biológica (produção de anticorpos, defesa contra bactérias, entre outros).

### ***Fibroblastos 3T3***

Os fibroblastos são células com origem na camada mesodermal. Estas células estão distribuídas ao longo do tecido conjuntivo nos animais, sendo as mais comuns (Jacob, 2011).

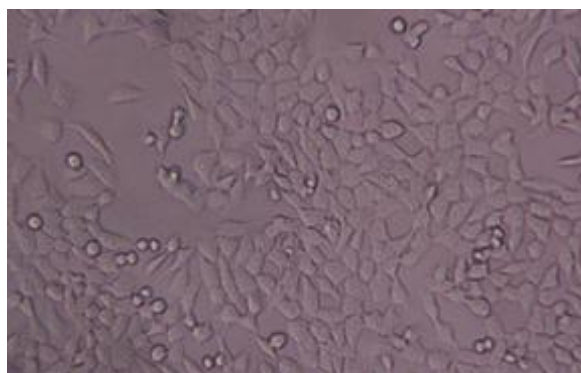
Os fibroblastos possuem uma forma fusiforme com diversos prolongamentos citoplasmáticos e um núcleo oval, sendo morfologicamente heterogêneos (Figura 6). A sua principal função é manter a integridade estrutural do tecido conjuntivo (Jacob, 2011).

Hoje em dia, os fibroblastos são reconhecidos como um componente central da biologia tecidual e apresentam funções importantes na regulação estrutural e fisiológica dos tecidos (Jacob, 2011).

O interesse de utilizar culturas de fibroblastos provém em grande parte das suas características favoráveis, como por exemplo, após o isolamento e estabelecimento de culturas, apresentam uma proliferação rápida e continua na presença de soro (Jacob, 2011).

Os fibroblastos 3T3 provêm de uma linha de células criadas em 1962, por dois cientistas, George Todaro e Howard Green. Originalmente, estes investigadores obtiveram as células 3T3 a partir de fibroblastos de ratinhos (suíços) embrionários. Esta nomenclatura deve-se ao facto das células de fibroblastos de ratinhos embrionários terem sido transferidas (“T”) a cada três dias (primeiro “3”) e possuírem uma densidade rígida de  $3 \times 10^5$  células (segundo “3”), ou seja, designação de “3T3” (Todaro & Green, 1963).

Teodoro e Green, utilizaram fibroblastos de murganhos embrionários em vez de usarem fibroblastos humanos pois esses possuem uma maior capacidade de se manterem estáveis, mesmo com várias passagens (Todaro & Green, 1963).



**Figura 6:** Imagem de células de fibroblastos 3T3 observados ao microscópio invertido com uma objetiva de 20×.

Os fibroblastos 3T3 foram escolhidos para o presente estudo por se tratar de uma linha celular, por apresentar facilidade de obtenção, de manutenção, de manipulação e de possuir a capacidade de se manter estável, mesmo após várias passagens. Refira-se ainda que, com base nos estudos de validação realizados pelo National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) e pelo European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), os fibroblastos BALB/c 3T3 são uma das linhagens recomendadas para a realização de testes de citotoxicidade, os quais devem ser rotineiramente considerados antes da realização de estudos de toxicidade aguda em ratinhos (OECD, 2010).

### **2.2.3. Morfologia das culturas celulares**

A morfologia (forma e aparência) das células deve ser observada periodicamente quando estas se encontram em cultura. A sua observação ao microscópio é igualmente importante para a deteção de possíveis sinais de contaminação (Ryan, 2008). Os sinais presentes na deterioração celular podem incluir o citoplasma vacuolizado, granularidade ao redor do núcleo e desprendimento das células do substrato. Isto pode ser causado por diversas razões como a contaminação da cultura, a presença de substâncias tóxicas no meio e a senescência (processo natural de envelhecimento) das células, que pode ser provocada pela não renovação do meio de cultura (Ryan, 2008).

As culturas celulares apresentam-se em duas formas distintas, em suspensão (as células sobrevivem e proliferam livres no meio de cultura) e em monocamada aderente (as células aderem a um substrato e propagam-se). Esta característica deve-se ao tecido do qual foram retiradas (Ryan, 2008). Refira-se que, no caso particular das células usadas neste trabalho, os linfócitos humanos crescem na forma de suspensão e os fibroblastos 3T3 crescem na forma de monocamada aderente.

A descrição das culturas celulares pode realizar-se com base na sua morfologia ou nas suas características funcionais. Sendo assim, pode-se dividir as culturas celulares em três grandes grupos: epiteliais, linfoblásticas e fibroblásticas (tipo fibroblastos). Epiteliais são células que aderem ao substrato e apresentam uma forma achatada e poligonal mas com dimensões mais regulares. Linfoblásticas são células que, normalmente, não aderem ao substrato permanecendo em suspensão apresentando uma forma esférica. Fibroblásticas refere-se às células que aderem ao substrato e apresentam uma forma alongada (Ryan, 2008).

A morfologia e as características funcionais descrevem as culturas celulares (Ryan, 2008).

#### **2.2.4 Contaminação de uma cultura celular**

Contaminar uma cultura celular pode trazer consequências muito graves em qualquer experiência. A contaminação de culturas celulares pode ocorrer por via química ou biológica. Sendo a primeira efetuada por agentes como toxinas, iões metálicos e vestígios de desinfetantes químicos efetuada e a segunda por bactérias, vírus, fungos, entre outros. Devido aos agentes em causa, considera-se que a contaminação química é algo mais difícil de detetar ao passo que a contaminação biológica pode por exemplo ser detetada através do pH, sendo por isso de mais fácil deteção. Apesar de ser possível reduzir as contaminações se forem seguidas técnicas de assepsia, refira-se que quando uma cultura se encontra contaminada não se consegue eliminar essa contaminação (Ryan, 2008).

As contaminações biológicas visíveis a olho nu podem ser controladas através de uma observação diária da cultura de células ao microscópio. Se se tratar de uma infeção

da cultura de células por vírus ou micoplasmas, a contaminação pode não ser visível a olho nu, mas por outro lado induzir redução da taxa de crescimento, fazer alterações morfológicas, entre outros (Ryan, 2008).

Na imagem seguinte pode-se observar um exemplo evidente de contaminação biológica por bactérias e fungos.



**Figura 7:** Placa de 12 poços, em que os poços com coloração amarela estão contaminados com bactérias e/ou fungos.

### **2.3. Citotoxicidade**

Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não pode ocasionar a morte das células nem afetar as suas funções celulares. Os efeitos citotóxicos quando provocam danos celulares intensos podem comprometer a viabilidade celular perturbando a integridade estrutural e/ou metabólica das células bem como a sua integridade reprodutiva provocando uma série de efeitos destrutivos. Sendo assim, com o uso das técnicas de cultura celular, os testes podem detetar a ocorrência de lise das células, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas (Daguano et al., 2007).

Atualmente, após a discussão iniciada no *International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity* realizado em 2000, e posterior realização de um estudo internacional de validação levado a cabo pelo NICEATM-ECVAM, considera-se que a determinação da citotoxicidade basal deve ser uma prioridade antes

da realização de qualquer teste *in vivo*. Tal, deve-se ao facto dos resultados de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória para 50% das células testadas) obtidos em estudos de citotoxicidade *in vitro* poderem ser utilizados para estimar a dose inicial a ser utilizada em testes de toxicidade oral aguda realizados em ratinhos, com o objetivo de determinar o LD<sub>50</sub>, que corresponde à dose oral que promove a morte de 50% dos animais testados.

Os testes *in vitro* são assim uma ferramenta muito importante uma vez que proporcionam a possibilidade de diminuição do número de animais usados e, conseqüentemente, a diminuição da dor e sofrimento que os testes *in vivo* causam (Valadares, 2006; Vieira, 2009; OECD, 2010).

O parâmetro mais investigado pelos testes de citotoxicidade é a viabilidade celular, sendo determinada por diversos processos celulares (Kroll et al., 2009). Existem diversos testes que são utilizados para a avaliação da citotoxicidade, como o teste do corante vermelho neutro, o teste de redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) ou o teste de libertação de enzimas citoplasmáticas como a lactato desidrogenase (LDH). De entre os que apresentam informação sobre diferentes funções celulares como o teste do MTT ou o teste do vermelho neutro são os mais usados (Kroll et al., 2009; Vicente, 2012).

### **2.3.1. Teste do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)**

Em 1983, Mosmann propôs um teste colorimétrico quantitativo para a avaliação da sobrevivência das células de mamíferos e de proliferação celular. Esse ensaio é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente ativas, converterem a solução aquosa de cor amarela do substrato MTT, num sal formazan, formado por cristais, com uma coloração azul-escuro/roxo, insolúveis em água. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Liu et al., 1997).

O teste do MTT tem vindo a ser usado numa vasta gama de células, incluindo culturas de células primárias e linhas celulares estabelecidas (Chapdelaine, 2010). A utilização deste teste para a avaliação do crescimento e sobrevivência celular oferece diversas vantagens pela sua rapidez, simplicidade, custo e segurança que lhe estão

associados. A sensibilidade do teste do MTT é dependente do tipo de célula, do seu estado metabólico médio e da técnica usada para solubilizar os cristais de formazan (Chapdelaine, 2010).

O teste colorimétrico tem que ser otimizado de forma a criar condições e duração do teste para se obter resultados satisfatórios. Uma curva padrão, número celular vs taxa de crescimento, para a produção de formazan deve ser determinada para cada tipo de célula. O teste MTT uma vez otimizado tem provado ser adaptável às necessidades da experiência e foi demonstrado ser um método prático (Chapdelaine, 2010).

Ao longo dos tempos, vários foram os estudos efetuados por diversos autores para aperfeiçoar o método MTT, tendo sido propostas algumas modificações, com particular ênfase num dos principais problemas verificados, nomeadamente a dificuldade em solubilizar os cristais de formazan (Chapdelaine, 2010).

Com as várias alterações feitas ao longo dos anos, o teste colorimétrico é actualmente considerado um teste quantitativo preciso, fácil de ser realizado, sensível, rápido e de baixo custo, sendo frequentemente usado para avaliar a viabilidade celular (Mosmann, 1983; Liu et al., 1997; Van et al., 2011). Este teste é descrito como um método muito útil para avaliação da citotoxicidade, proliferação e ativação celular *in vitro* (Van et al., 2011).

Ao longo dos tempos o teste do MTT tem sido aperfeiçoado e aplicado em diversos estudos de citotoxicidade incluindo a avaliação da toxicidade de nanopartículas (Kroll et al., 2009).

### **2.3.2 Teste de incorporação do corante vermelho neutro**

Este teste consiste na capacidade das células viáveis incorporarem e capturarem o corante vermelho neutro (hidroclorato de 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-fenazina) nos lisossomas. Desde 1984 o vermelho neutro tem sido usado como corante para avaliação da viabilidade celular e desde então tem vindo a ser utilizado em inúmeros testes de citotoxicidade, proliferação celular e adesão (Kroll et al., 2009). Este teste baseia-se na determinação da perda da viabilidade celular por meio da medida da inibição da captação do corante vermelho neutro. Este é um corante catiónico fraco que

penetra na membrana das células viáveis por difusão iónica, concentrando-se nos lisossomas (pH lisossómico < pH citoplasmático). Assim sendo, pode-se distinguir células viáveis, nomeadamente aquelas que absorveram o corante vermelho neutro, de células inviáveis que não absorveram o corante, conseguindo-se assim obter uma estimativa do número de células viáveis existentes numa cultura (Borenfreund & Puerner, 1985; Repetto et al., 2008). Normalmente o teste do corante vermelho neutro é realizado em células aderentes (Graulab, 2013).

O teste vermelho neutro é um dos testes de citotoxicidade mais utilizados, tendo muitas aplicações biomédicas e ambientais, por ser considerado um teste *in vitro* eficiente, simples, preciso, que permite obter resultados reprodutíveis, de custo baixo e eficaz para seleccionar substâncias que possuem um potencial citotóxico (Borenfreund & Puerner, 1985; Repetto et al., 2008; Vicente, 2012).

## **TERCEIRO CAPÍTULO**

### **Material e Métodos**

Neste capítulo apresenta-se a informação relativa aos reagentes, soluções, equipamentos e procedimentos utilizados para a realização deste trabalho. Brevemente, foram utilizadas dois tipos de células, linfócitos humanos e fibroblastos 3T3 de murganho, e quatro diferentes tipos de nanotransportadores preparados sem substância ativa (doravante designados como “brancos”), nomeadamente transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC), nanoesferas (NE), nanocápsulas (NC) e lipossomas (LIP). Estas células foram expostas a oito concentrações diferentes de cada nanotransportador e com base nos testes de citotoxicidade realizados, MTT e vermelho neutro, avaliou-se a viabilidade celular relativamente a essas oito concentrações. Verificou-se também a morfologia celular por visualização direta ao microscópio invertido e por coloração com o corante rápido Instant Prov.

### **3.1 Material**

Em seguida apresenta-se as soluções, os reagentes e os equipamentos utilizados para a realização da parte prática desta dissertação.

#### **3.1.1 Soluções / Reagentes**

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular em linfócitos humanos, nomeadamente para efetuar a separação e isolamento das células, e posteriormente a sua proliferação e crescimento, foi necessária a utilização das seguintes soluções:

- Meio de cultura – RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)

O meio de cultura RPMI 1640 (pH  $7,2 \pm 0,4$ ), corresponde a 10,4 g/L de pó comercial (Sigma<sup>®</sup> – Aldrich, St. Louis, Mo, USA), acrescido de 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 5,95 g/L de HEPES e 1 mL/L de penicilina. Esta solução foi armazenada a -20°C.

- Histopaque<sup>®</sup> – 1077 Hybri max

O histopaque era constituído por 5,7 g/dL de polissacarose e 9 g/dL de diatrizoato de sódio. Esta solução foi armazenada entre 2 e 8°C. (Sigma<sup>®</sup> – Aldrich, St. Louis, Mo, USA).

- Soro fetal bovino (SFB)

Esta solução foi adquirida à Invitrogen (Eugene, OR, EUA) sendo armazenada a uma temperatura de -20°C.

- Fitohemaglutinina PHA-M

A fitohemaglutinina foi adquirida à Sigma<sup>®</sup> (Aldrich, St. Louis, Mo, USA) sendo mantida a uma temperatura de - 20°C.

Para a realização dos estudos de viabilidade celular em fibroblastos 3T3, nomeadamente para a proliferação e cultura das células e sua posterior desagregação, utilizou-se:

- Meio de cultura – DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

O meio de cultura DMEM (pH 7,7 +/- 0,4), corresponde a 13,4g/L de pó comercial (Sigma<sup>®</sup> – Aldrich, St. Louis, Mo, USA), 2,7g/L de HEPES, 3,5g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 100U/mL de penicilina e 1,55g/L de L-glutamina. Este meio foi mantido a temperaturas negativas (-20°C).

- Soro fetal bovino (SFB)

- Solução tampão fosfato salina (PBS)

O PBS contém 7,2g/L de cloreto de sódio (NaCl), 0,76g/L de monofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 5,9g/L de fosfato de dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Esta solução foi mantida a uma temperatura entre 2 e 8°C.

- Tripsina

A solução de tripsina continha por 2,5g/L de tripsina e 0,3g/L de EDTA, sendo mantida a uma temperatura de -20°C.

Para realizar a contagem de células viáveis, em ambos os casos, linfócitos humanos e fibroblastos 3T3, utilizou-se a seguinte solução de corante:

- Corante azul de tripano 0,2%

O Corante azul de tripano 0,2% foi preparado com uma solução de 800mL/L de tampão fosfato salina e 200mL/L de solução *stock* 1% de azul de tripano. Esta solução encontrava-se à temperatura ambiente.

Para a realização do teste de citotoxicidade em linfócitos, utilizou-se:

- MTT - (Brometo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio])

O MTT, que corresponde a 5 g/L de pó comercial (Sigma® – Aldrich, St. Louis, Mo, USA) diluído em água ultrapura. O reagente era armazenado a uma temperatura baixa de -20°C.

- Dimetilsulfóxido (DMSO)

Este reagente ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) encontrava-se à temperatura ambiente. (Vetec, RJ, Brasil).

Para o teste de citotoxicidade dos fibroblastos 3T3 usou-se:

- Corante vermelho neutro (NR)

O corante vermelho neutro era composto por 2,5g de pó comercial da solução de vermelho neutro (Sigma® – Aldrich, St. Louis, Mo, USA) em 1L de água destilada. O corante NR foi mantido à temperatura ambiente.

- Solução de fixação do corante vermelho neutro

A solução de fixação de vermelho neutro continha 1% de ácido acético glacial P.A. (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), 50% de álcool etílico absoluto (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) e 49% de água destilada. Este fixador encontrava-se à temperatura ambiente.

Para a coloração dos linfócitos humanos e fibroblastos 3T3 usou-se o seguinte corante:

- Instant prov

O Instant prov é um conjunto de três corantes rápidos, que se encontravam à temperatura ambiente.

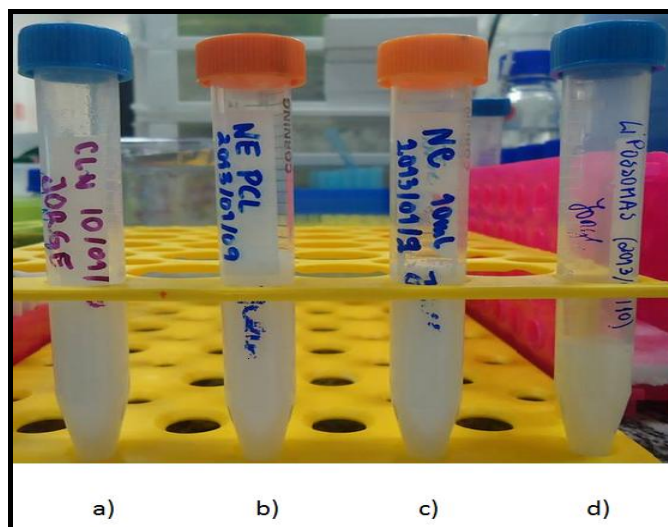
### **3.1.2 Equipamentos**

Seguidamente elenca-se de uma forma geral os equipamentos utilizados neste trabalho:

- Centrifuga Refrigerada Rotina 38R (Hettich, Tuttlingen, Germany);
- Estufa CO<sub>2</sub> Revco (Thermo Electron, Massachusetts, EUA);
- Câmara de Fluxo Laminar Horizontal (Esco, Hatboro, PA, EUA);
- Homogenizador de 4 placas Orbit P4 Digital (Labnet, Nova Jersey, EUA);
- Espectrofotómetro Stat Fax 2100 Microplate Reader (Awareness Technologies, Palm City, FL, EUA);
- Espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Electron, Massachusetts, EUA);
- Microscópio invertido DM IL (Leica, Wetzlar, Germany);
- Microscópio ótico DME (Leica, Wetzlar, Germany);
- Banho de água (Nova Ética, SP, Brasil).

### **3.2. Nanotransportadores sem substância ativa (brancos)**

Como referido, para o estudo da citotoxicidade dos nanotransportadores em função da densidade populacional desses mesmos no meio, utilizou-se quatro tipos de nanotransportadores brancos: lipossomas (LIP), transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC), nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE) (Figura 8). Inicialmente foram realizados ensaios de citotoxicidade, com linfócitos humanos. Com base nos resultados obtidos e estudos prévios realizados pela equipa de investigação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia/UFG do Brasil, optou-se por não utilizar os lipossomas nos ensaios realizados com a linha de fibroblastos de murganhos (camundongos). Assim, nesta linha avaliou-se apenas a viabilidade celular quando as células são expostas a diferentes concentrações de 3 tipos de nanotransportadores brancos: NC, NE e NLC. Os nanotransportadores brancos e os resultados referentes às suas características físico-químicas foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Sistemas de Libertação de Fármacos da Faculdade de Farmácia/UFG do Brasil.



**Figura 8:** Imagem dos nanotransportadores: a) Transportadores lipídicos nanoestruturados, b) Nanoesferas, c) Nanocápsulas, d) Lipossomas.

As nanopartículas poliméricas (NE e NC) foram preparadas pelo método da nanoprecipitação, tendo-se utilizado como polímero a poli- $\epsilon$ -caprolactona e como tensioativos o tween 80 e span 60. A poli- $\epsilon$ -caprolactona é considerada como sendo biodegradável, biocompatível e não tóxica. Como referido anteriormente, as nanocápsulas poliméricas diferem das nanoesferas por incluírem um óleo na sua composição. Neste caso, o óleo utilizado foi o captex® 355 (triacilglicerol com ácidos gordos de cadeia média, maioritariamente ácidos cáprico e caprílico).

Os NLC utilizados foram obtidos pelo método da homogeneização a alta pressão a quente, sendo compostos por um lípido sólido à temperatura ambiente (monoestearato de glicerilo), por um lípido líquido (ácido oleico) e por tensioativos, nomeadamente span 60 e copolímero poloxamer 188.

Os LIP foram preparados pelo método da hidratação do filme lipídico, seguido de extrusão (com membrana de 200  $\mu$ m) tendo-se utilizado apenas um fosfolípido (fosfatidilcolina de soja) e água para sua obtenção.

A caracterização dos nanotransportadores brancos foi realizada através de três técnicas, de forma a obter as características de cada um no que respeita ao tamanho

médio (diâmetro hidrodinâmico médio), ao índice de polidispersão (Pdi), à carga superficial dos nanotransportadores (potencial zeta), ao pH e à concentração de cada.

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão realizou-se pela técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS - “*Dynamic Light Scattering*”) pela utilização do equipamento Zetasizer Nano-S (Malvem, Reino Unido) com um laser de Hélio-Neon de 5 mW de potência contínua e um comprimento de onda de 663 nm.

A carga superficial dos nanotransportadores foi calculada através da determinação do potencial zeta das partículas sendo este calculado através da mobilidade eletroforética das partículas quando sujeitas a um campo elétrico. O potencial zeta foi medido através do equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Corporation, USA).

O cálculo da concentração das partículas realizou-se através da técnica de análise de localização de partículas (NTA - “*Nanoparticle Tracking Analysis*”) utilizando-se o equipamento NS500 (Nanosight, Reino Unido). Esta técnica é usada para a análise, visualização direta e em tempo real de nanotransportadores em meio líquido baseado no movimento Browniano e nas propriedades de dispersão de luz (Nanosight, 2013). Com base nesta técnica, determinou-se a concentração dos nanotransportadores diretamente provenientes da etapa de síntese (obtendo-se uma gama de valores de concentração entre  $2,1 \times 10^{12}$  part/mL e  $5,71 \times 10^{13}$  part/mL), o que permitiu efetuar as diluições necessárias para que todas as amostras ficassem com a mesma concentração ( $2,1 \times 10^{12}$  part/mL).

Os valores de pH foram obtidos através de um leitor de pH digital (pHmetro, USA).

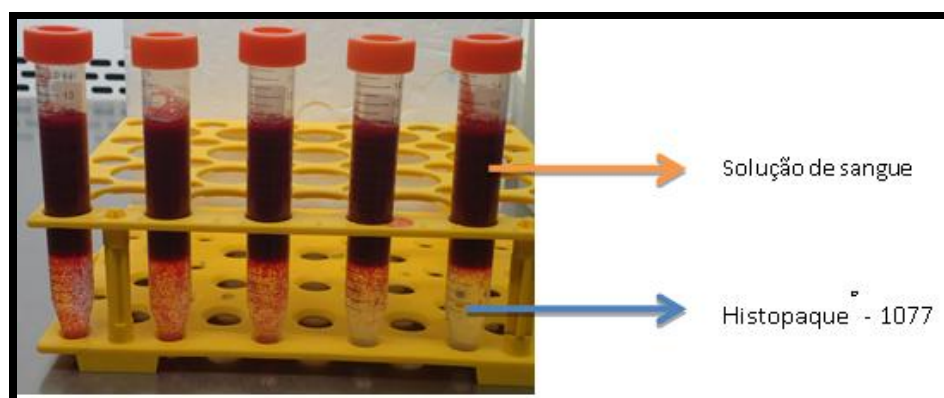
### **3.3. Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores numa cultura primária de linfócitos humanos**

Para a investigação da citotoxicidade dos nanotransportadores foi utilizada uma cultura primária de linfócitos humanos. As células mononucleares (CMN) do sangue periférico foram obtidas a partir de um indivíduo do sexo masculino, saudável, atendido

pelo laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da UFG, Brasil, sendo doador voluntário.

Para evitar contaminações, os procedimentos foram realizados em condições assépticas e na câmara de fluxo laminar.

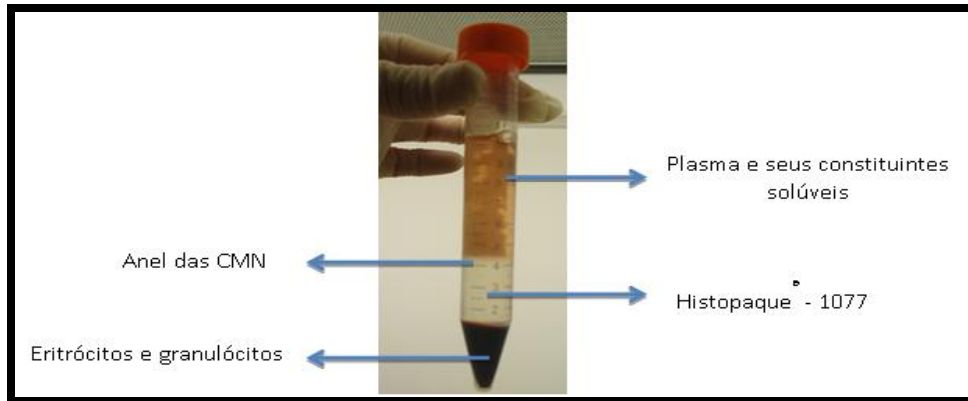
Colheu-se 20 mL de sangue periférico em tubos a vácuo estéreis, heparinizados. Após a colheita verteu-se o sangue periférico para um tubo de falcon de 50 mL, completando-o com meio RPMI 1640 até perfazer 40 mL. De seguida, realizou-se a separação dos linfócitos em 5 tubos de falcon de 15 mL. Para tal, introduziu-se 4 mL de Histopaque® - 1077 em cada um dos 5 tubos e, cuidadosamente com uma pipeta Pasteur, colocou-se sobre esta fase 8 mL da solução de sangue (Figura 9). Os cinco tubos foram posteriormente centrifugados durante 20 minutos a 2000 rpm.



**Figura 9:** Tubos de falcon contendo Histopaque® - 1077 em contacto com a solução de sangue.

Após centrifugação, a qual permitiu a separação de forma visível das diferentes fases, procedeu-se à remoção, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, do anel contendo as CMN situado na interface da fase superior (contendo plasma e seus constituintes solúveis) com Histopaque® - 1077 (Figura 10). De referir que no fundo do tubo ficou a fase contendo os eritrócitos e granulócitos, os quais foram descartados (à semelhança do histopaque e fase superior contendo plasma). Os anéis contendo as CMN removidos dos cinco tubos foram reunidos num tubo de falcon (50 mL) ao qual se adicionou meio RPMI 1640 até completar aproximadamente o volume máximo do tubo, procedendo-se

seguidamente à sua centrifugação durante 10 minutos a 1500 rpm. Esta etapa foi realizada duas vezes.



**Figura 10:** Diferentes fases após a centrifugação.

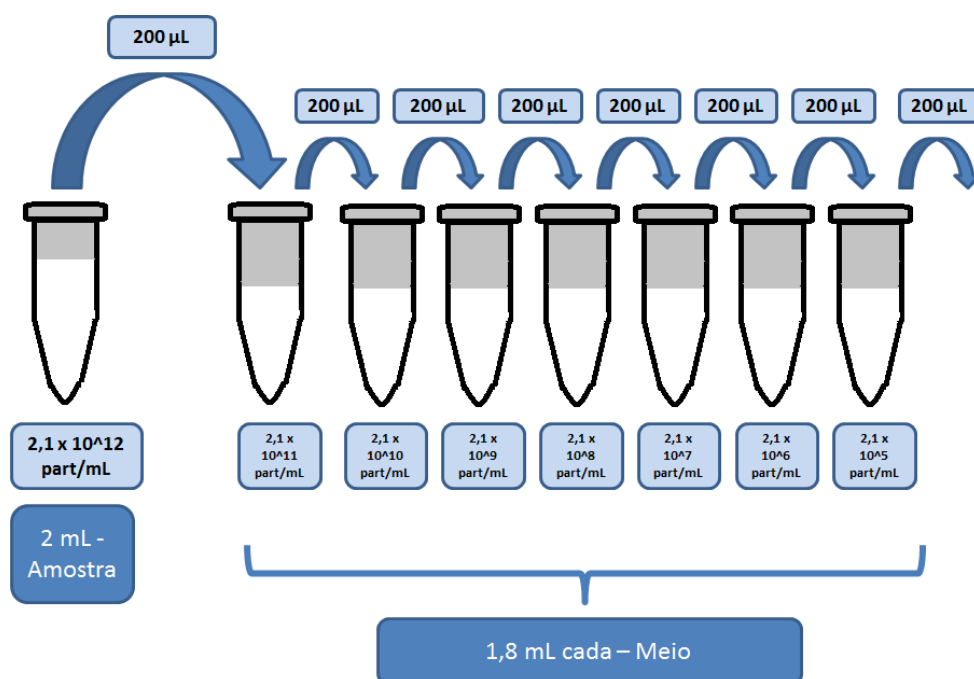
Após a centrifugação, as CMN foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640, tendo-se adicionado 500  $\mu$ L da suspensão celular assim obtida a dois frascos de cultura celular de 20 mL cada um contendo 2 mL de SFB, 1 mL de fitohemaglutinina PHA-M e 17 mL de meio RPMI 1640 (Figura 11). Após observação dos frascos de cultura celular ao microscópio invertido, estes foram colocados na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C ( $\pm$  1°C), 90% ( $\pm$  10%) de humidade e 5% ( $\pm$  1%) de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Foi-se observando, todos os dias, ao microscópio invertido o crescimento celular.



**Figura 11:** Frascos de cultura celular contendo cada um 2 mL de SFB, 1 mL de fitohemaglutinina PHA-M, 17 mL de meio RPMI 1640 e 500  $\mu$ L da solução celular.

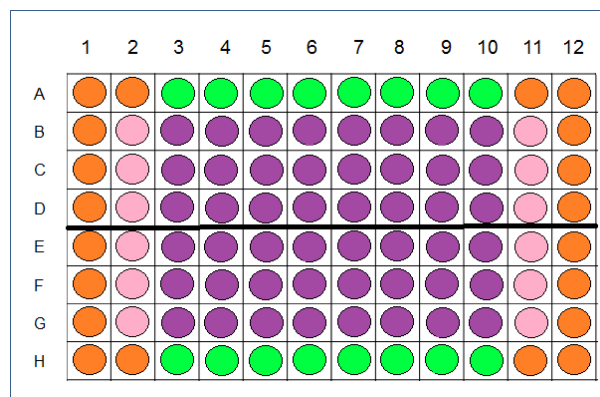
Após as 72 horas, observou-se ao microscópio invertido o crescimento celular e procedeu-se à remoção das células do frasco de cultura celular cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de 5 mL para um tubo de falcon (50 mL), o qual foi centrifugado durante 10 minutos a 1500 rpm. Após ressuspensão do *pellet* obtido em 1 mL de RPMI 1640, retirou-se uma alíquota de 20  $\mu$ L desta suspensão, procedendo-se à sua diluição em 180  $\mu$ L de azul de tripano a 0,2% para a contagem das células viáveis ao microscópio ótico em câmara de Neubauer. Com base no número obtido, preparou-se uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL, tendo-se diluído com quantidade adequada de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB.

Os quatro nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) apresentaram uma concentração inicial de  $2,1 \times 10^{12}$  part/mL. Estas amostras foram diluídas em meio RPMI 1640 (diluição decimal seriada), tendo-se obtido um total de em oito concentrações diferentes (de  $2,1 \times 10^{12}$  a  $2,1 \times 10^5$  part/mL). A Figura 12 representa esquematicamente a forma como foram realizadas essas diluições.



**Figura 12:** Representação esquemática das diluições dos nanotransportadores.

Depois de se ter efetuado as diluições, foram preenchidas duas placas de 96 poços com duas amostras de nanotransportadores cada, sendo que este teste foi realizado em triplicado para cada concentração. Colocou-se 100 µL de meio RPMI 1640 nos poços a cor-de-laranja, adicionou-se 10 µL de meio RPMI 1640 e 90 µL da suspensão celular nos poços a cor-de-rosa, colocou-se 10 µL de cada concentração de partículas e 90 µL de meio RPMI 1640 nos poços a verde e nos poços a roxo 10 µL de cada concentração e 90 µL da suspensão celular (Figura 13). As placas foram colocadas na estufa de CO<sub>2</sub> (37°C (± 1°C), 90% (± 10%) de humidade e 5% (± 1%) de CO<sub>2</sub>) por 24 horas.



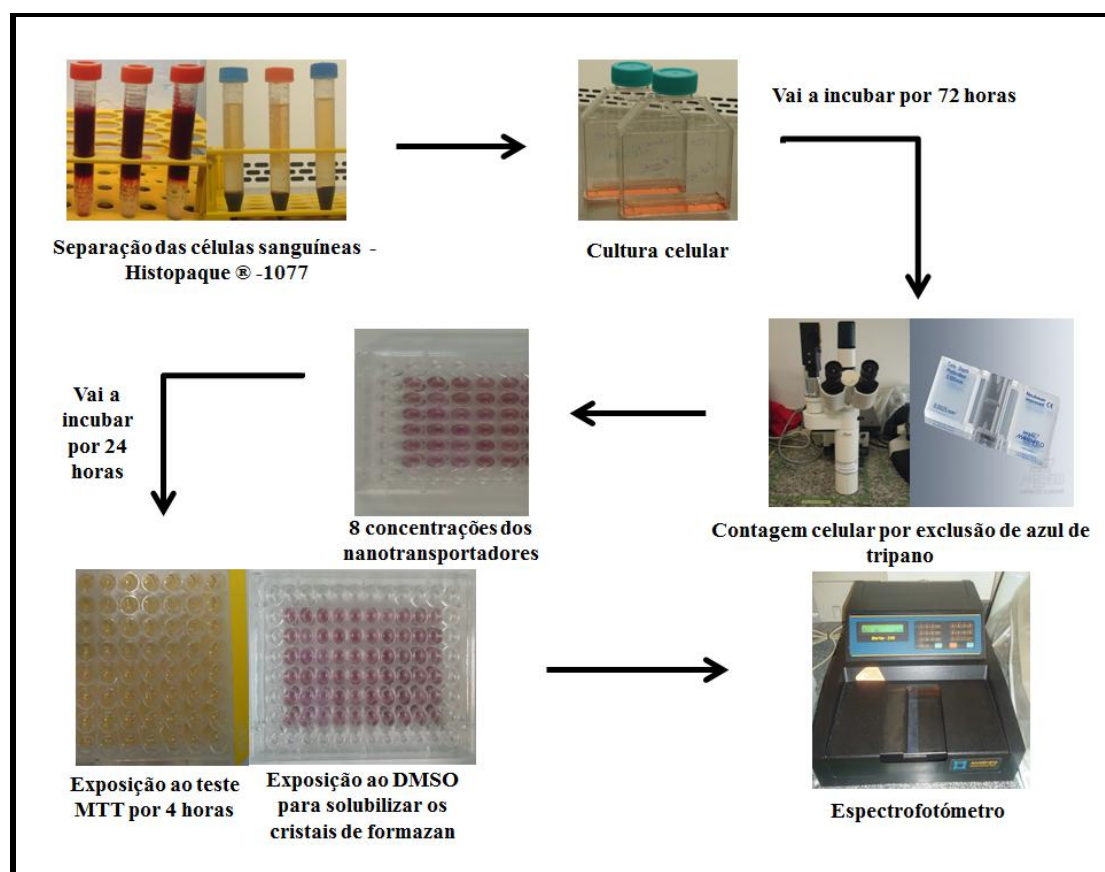
**Figura 13:** Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a cor-de-laranja correspondem a ensaios em branco (apenas contêm meio RPMI), os poços a cor-de-rosa são os poços de controlo (células expostas somente a meio RPMI), os poços a verde contêm a amostra e meio RPMI e os poços a roxo correspondem aos poços contendo 8 concentrações da amostra e células. A placa foi dividida, sendo avaliadas duas amostras.

### **3.3.1 Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores pelo método MTT**

A citotoxicidade dos nanotransportadores foi avaliada pelo método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que, quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) num composto colorido designado formazan (um sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) (Araújo et al., 2012).

Após 24 horas de incubação, as placas de 96 poços foram observadas ao microscópio invertido. Seguidamente adicionou-se 10 µL de MTT em cada poço da

placa, sendo esta colocada novamente na estufa de a 37°C ( $\pm$  1°C), 90% ( $\pm$  10%) de humidade e 5% ( $\pm$  1%) de CO<sub>2</sub> por 4 horas, para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente descartou-se com cuidado o sobrenadante e adicionou-se 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido em cada poço, para solubilizar os cristais de formazan, levou-se a placa para o homogeneizador de 4 placas entre 15 a 20 minutos e realizou-se a leitura no espectrofotómetro com um comprimento de onda de 550nm. A Figura 14 apresenta uma representação esquemática dos procedimentos realizados ao longo da experiência com vista à avaliação da citotoxicidade dos nanotransportadores em linfócitos humanos.



**Figura 14:** Representação esquemática dos procedimentos para avaliação da citotoxicidade dos nanotransportadores em linfócitos humanos.

### **3.4. Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores numa Linha de fibroblastos BALB/c 3T3-A31**

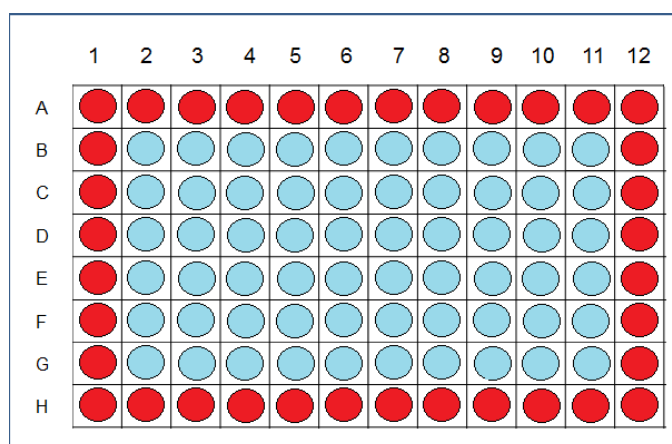
Para a investigação de citotoxicidade dos nanotransportadores brancos foi utilizada a linha de fibroblastos 3T3-A31 proveniente de tecido embrionário de murganho BALB/c. Esta linha, indicada pela ICCVAM, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Para evitar contaminações, os procedimentos foram realizados em condições assépticas, na câmara de fluxo laminar.

As células BALB/c 3T3 foram cultivadas em monocamadas, em frascos de cultura celular estéreis contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e incubados em estufa a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), 90% ( $\pm 10\%$ ) de humidade e 5% ( $\pm 1\%$ ) de CO<sub>2</sub> até apresentarem um crescimento contínuo, sendo esta linha aderente.

Após verificação do crescimento das células em monocamada por observação ao microscópio invertido, com confluência entre 50 e 80%, procedeu-se à sua remoção do frasco de cultura celular, através de desagregação enzimática com solução de tripsina/EDTA. Para tal, retirou-se o meio de cultura do frasco, procedendo-se em seguida à lavagem das células com 3mL de PBS, sendo este passo feito com o intuito de remover o SFB, uma vez que este inativa a solução de tripsina/EDTA. Após remoção do PBS, adicionou-se 1mL da solução de tripsina/EDTA por um curto período de tempo ( $\pm 30$  segundos) e durante esse tempo observou-se ao microscópio invertido para verificar se a desagregação ocorreu corretamente e seguidamente descartou-se a tripsina/EDTA. Para ajudar á desagregação total, agitou-se cuidadosamente o frasco de cultura. Após a desagregação química das células, adicionou-se 10 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB para a inativação da tripsina/EDTA. Para melhor obtenção de uma suspensão celular homogénea, realizou-se uma desagregação mecânica com a ajuda de uma micropipeta. Esta suspensão foi então centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, e o *pellet* contendo as células foi ressuspenso em 1mL de DMEM. Da suspensão assim obtida retirou-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$ , a qual foi diluída em 180  $\mu\text{L}$  de azul de tripano a 0,2% para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, por microscopia

ótica. Com base no número de células contadas, procedeu-se à diluição com meio DMEM suplementado com 10% de SFB, a fim de se obter uma suspensão contendo  $3 \times 10^4$  células viáveis/mL. Esta suspensão foi seguidamente dispensada numa placa de 96 poços, tendo-se colocado 100  $\mu$ L de suspensão celular nos poços internos da placa (representados a azul na Figura 15) e 100  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% SFB (sem células) nos poços periféricos da placa (representados a vermelho na Figura 15). Estes últimos são utilizados como ensaio em branco, servindo ainda como fonte de humidade aos poços que contêm as células. A placa foi colocada por aproximadamente 24 horas na estufa a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $90 \pm 10\%$  de humidade e  $5 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$ , até que a confluência das células fosse aproximadamente de 50%. A placa foi examinada ao microscópio invertido, onde se pode verificar o crescimento e a aderência das células na placa.



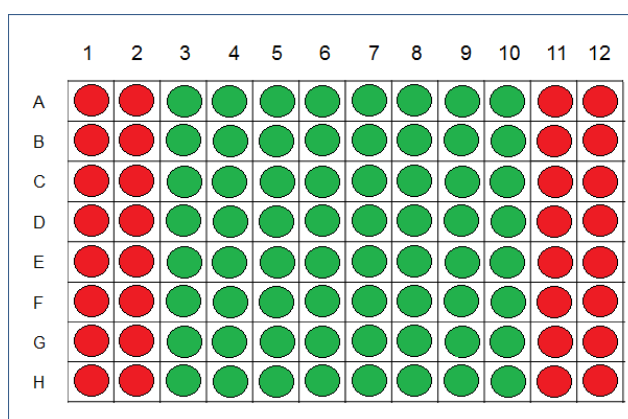
**Figura 15:** Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a vermelho contêm 100  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços representados a azul contêm 100  $\mu$ L da suspensão celular.

### **3.4.1. Exposição das células BALB/c 3T3-A31 aos nanotransportadores**

Os três nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas e transportadores lipídicos nanoestruturados) utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular com uma concentração inicial de  $2,1 \times 10^{12}$  part/mL. Estas amostras foram diluídas em meio DMEM, sendo testadas em oito concentrações diferentes

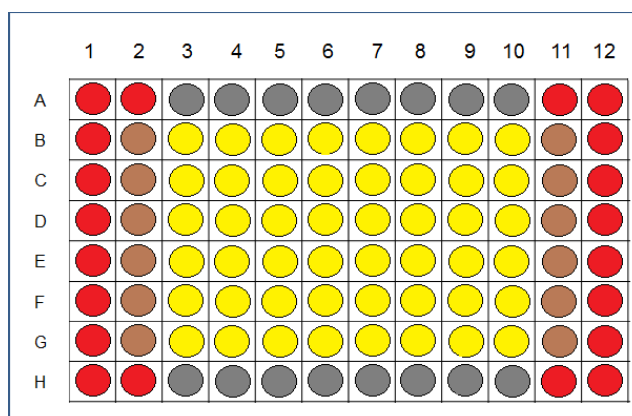
obtidas por diluição seriadas (diluições decimais de  $2,1 \times 10^{12}$  a  $2,1 \times 10^5$  part/mL) (Figura 12).

Depois de se ter efetuado as diluições e após 24 horas de permanência da placa na estufa, o meio de cultura da placa foi retirado por inversão, em condições de assepsia. Imediatamente de seguida colocou-se 100  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB nos poços das colunas 1, 2, 11 e 12 (representados a vermelho na Figura 16) e 90  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB adicionado de 10  $\mu$ L de cada concentração de nanotransportadores nos restantes poços (representados a verde na Figura 16). Este teste foi realizado em sextuplicado para cada concentração.



**Figura 16:** Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a vermelho contêm 100  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços representados a verde contêm 90  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 10  $\mu$ L de cada concentração a ser avaliada.

Após a exposição das células BALB/c 3T3-A31 aos nanotransportadores, colocou-se a placa na estufa ( $37^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$ ,  $90\% (\pm 10\%)$  de humidade e  $5\% (\pm 1\%)$  de  $\text{CO}_2$ ) por 48 horas, tendo-se observado ao microscópio invertido após este período. A Figura 17 apresenta o esquema da placa de 96 poços, evidenciando a composição final de cada poço.



**Figura 17:** Esquema da placa de 96 poços, onde os poços representados a vermelho correspondem a ensaios em branco (apenas contêm meio DMEM), os poços representados a castanho correspondem aos poços de controlo (células expostas somente ao meio DMEM), os poços representados a amarelo correspondem aos poços das 8 concentrações de nanotransportadores testadas e os poços representados a cinzento contêm nanotransportadores e o meio DMEM.

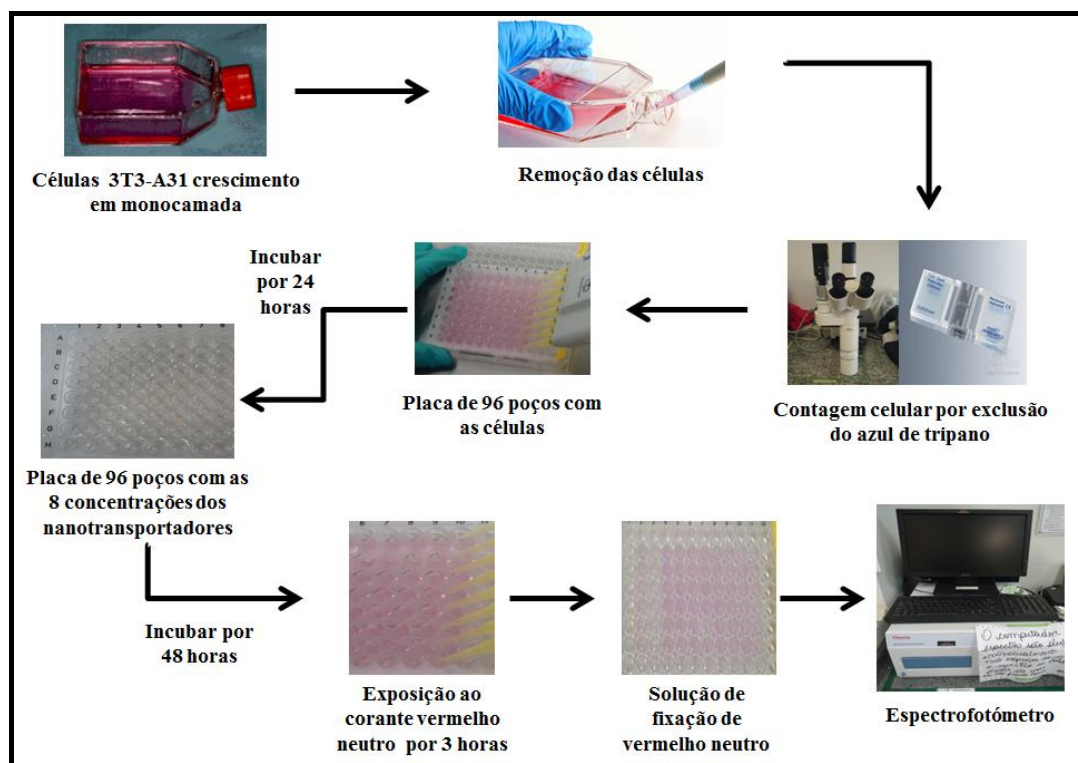
### 3.4.2 Avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores pelo teste de captação do corante vermelho neutro

O teste de captação do corante vermelho neutro permite avaliar a sobrevivência e a viabilidade celular, baseando-se na capacidade das células viáveis em incorporarem o corante nos lisossomas (Borenfreund & Puerner, 1985).

Após 48 horas de exposição das células BALB/c 3T3-A31 aos nanotransportadores, o sobrenadante da placa foi retirado por inversão. Colocou-se 200µL da solução de vermelho neutro (feita no próprio dia) em cada poço da placa e incubou-se em estufa a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), 90% ( $\pm 10\%$ ) de humidade e 5% ( $\pm 1\%$ ) de CO<sub>2</sub> durante 3  $\pm$  0,1 horas. Durante o tempo de incubação, observou-se a placa no microscópio invertido para verificar a formação de cristais.

Após o período de incubação, removeu-se o corante vermelho neutro da placa por inversão desta e colocou-se 200 µL de PBS pré-aquecido, a 37°C em banho de água, em cada poço da placa para lavagem das células, descartando-se em seguida o PBS por inversão da placa. Seguidamente adicionou-se 100 µL da solução de fixação do vermelho neutro em cada poço da placa. A placa foi levada para o homogeneizador de 4 placas entre 30 a 45 minutos, tendo-se protegido esta da luz pela colocação de papel de

alumínio, para a leitura ser realizada no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 550nm. A Figura 18 faz a representação esquemática dos procedimentos realizados ao longo do ensaio da viabilidade celular em fibroblastos 3T3.



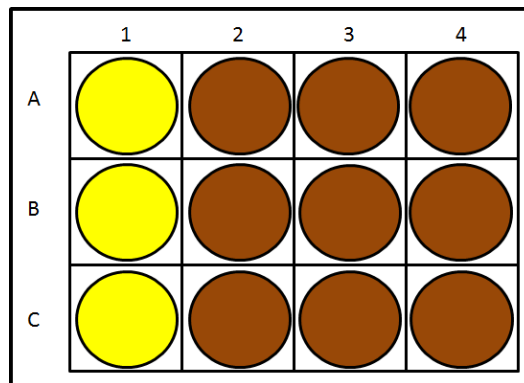
**Figura 18:** Representação esquemática dos procedimentos para avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores em fibroblastos 3T3 – A31.

### **3.5 Análise da morfologia celular**

A análise da morfologia celular permitiu observar o tipo, a quantidade, o tamanho, a disposição dos organelos e as estruturas de uma determinada célula, possibilitando ter uma ideia da sua atividade funcional. Para esta análise utilizou-se o corante Instant Prov, sendo este composto por corantes ácidos e básicos para que todas as estruturas celulares possam ser coradas, conforme a sua afinidade (NewProv, 2013).

### 3.5.1 Morfologia celular com corante Instant Prov em células BALB/c 3T3-A31

Após o crescimento das células, estas foram removidas dos frascos de cultura celular e procedeu-se à contagem das mesmas, como descrito no ponto 3.4. A suspensão celular assim obtida foi utilizada para o preenchimento de 3 colunas de uma placa de cultura celular de 12 poços (representados a castanho na Figura 19), tendo-se colocado na outra coluna 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB (representado a amarelo na Figura 19). A placa foi colocada durante aproximadamente 24 horas na estufa a 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), 90% ( $\pm 10\%$ ) de humidade e 5% ( $\pm 1\%$ ) de CO<sub>2</sub>, até que a confluência das células estivesse em torno de 50%.

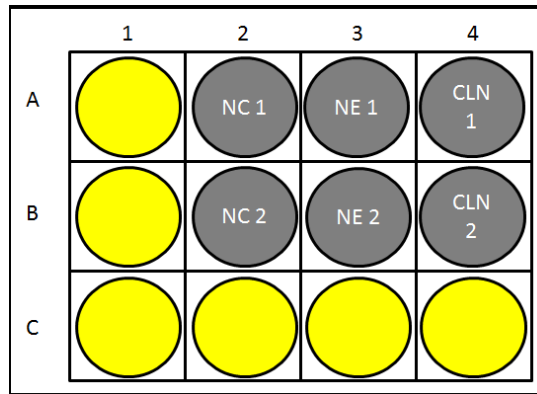


**Figura 19:** Esquema da placa de 12 poços, onde os poços representados a amarelo contêm 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços a castanho contêm 2 mL da suspensão celular.

Nesta fase, utilizaram-se três nanotransportadores (NC, NE e NLC) sendo testadas somente as suas duas maiores concentrações ( $2,1 \times 10^{12}$  part/mL e  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL) (Figura 12).

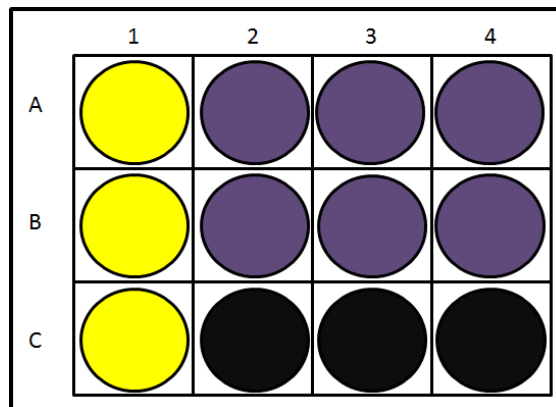
Após a placa ter sido retirada da estufa, removeu-se o meio de cultura por inversão e colocou-se 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB nos poços da coluna 1 e linha C (representados a amarelo na Figura 20) e 1,8 mL de meio DMEM adicionado de 200  $\mu\text{L}$  de cada concentração dos nanotransportadores nos restantes poços (representados a cinzento na Figura 20). Após a exposição da suspensão celular

aos nanotransportadores, colocou-se a placa na estufa (37°C (± 1°C), 90% (± 10%) de humidade e 5% (± 1%) de CO<sub>2</sub>) durante 48 horas.



**Figura 20:** Esquema da placa de 12 poços, onde os poços representados a amarelo contêm 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e os poços a cinzento contem 1,8 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 200 µL de cada concentração de nanotransportadores em que NC1, NE 1 e NLC 1 correspondem à concentração mais elevada ( $2,1 \times 10^{12}$  part/mL) e NC 2, NE 2 e NLC 2 à concentração seguinte ( $2,1 \times 10^{11}$  part/mL).

Após incubação, a placa foi observada ao microscópio invertido. A figura 21 apresenta a composição final de cada poço da placa de 12 poços.



**Figura 21:** Esquema da placa de 12 poços, onde os poços representados a amarelo são os ensaios a branco (apenas contêm meio DMEM), a preto são os poços de controlo (células expostas somente ao meio DMEM) e a roxo são os poços das duas maiores concentrações dos três nanotransportadores (NC, NE e NLC).

Após as 48 horas, retirou-se a placa da estufa de CO<sub>2</sub> e removeu-se o meio que esta continha por inversão. Colocou-se num poço 1 mL do primeiro corante (Instant

Prov I) deixando-se atuar durante cinco segundos. De seguida, inverteu-se a placa para retirar o corante e colocou-se 1 mL do segundo corante (Instant Prov II). Deixou-se atuar durante cinco segundos e inverteu-se novamente a placa. Por fim, adicionou-se 1 mL do terceiro corante (Instant Prov III) ficando este durante novamente cinco segundos, inverteu-se igualmente a placa e lavou-se o poço em questão com água desionizada. Poço a poço foi-se repetindo este procedimento com exceção dos poços representados a amarelo na Figura 21. A visualização das células coradas foi realizada através do microscópio invertido.



## QUARTO CAPÍTULO

### Resultados e Discussão

#### 4.1 Caracterização dos nanotransportadores

São vários os trabalhos publicados sobre a avaliação *in vitro* de nanocitotoxicidade, contudo, como referido na revisão publicada por Kroll e colaboradores (2009), a maioria utiliza partículas para as quais não foi realizada a devida caracterização relativamente à sua composição e propriedades físico-químicas. Pelo seu tamanho diminuto, as nanopartículas podem exibir propriedades específicas sendo por esse motivo imperioso proceder à avaliação do seu tamanho médio (e respetiva distribuição), carga superficial, entre outras propriedades. Para além da relevância em estudos de citotoxicidade *in vitro*, a determinação do tamanho de nanotransportadores é também importante do ponto de vista da administração *in vivo*, uma vez que a sua biodistribuição/eliminação no organismo pode ser diferente conforme o tamanho, por exemplo as partículas mais pequenas podem ser eliminadas por excreção renal, ao passo que as partículas maiores podem sofrer a ação de células do sistema fagocítico mononuclear presentes no fígado e baço (Kroll et al., 2009).

Atualmente encontram-se disponíveis várias técnicas baseadas em diferentes princípios físicos que permitem medir tamanhos de partículas inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , tais como *Light Scattering*, *Laser Light Diffraction*, microscopia eletrónica ultracentrifugação analítica, entre outros (Gaumet et al., 2008). O tamanho hidrodinâmico médio das partículas, bem como a distribuição de tamanho (ou índice de polidispersão, Pdi) dos nanotransportadores utilizados neste trabalho foram determinados por *Dynamic Light Scattering* (DLS). A técnica de DLS é baseada na capacidade das partículas em suspensão se difundirem em todas as direções e encontrarem-se em constante movimento (movimento Browniano das partículas), sendo que este movimento faz com que a luz laser incidente nas partículas seja difundida com diferentes intensidades. A distribuição de tamanhos pode apresentar-se como sendo

unimodal (apresenta uma população), plurimodal (apresenta várias populações), monodispersa (contendo uma distribuição restrita) ou polidispersa (contendo uma ampla distribuição). O índice de polidispersão apresenta uma escala de valores compreendida entre 0 e 1 em que os valores inferiores a 0,1 são considerados um “bom” índice de polidispersão, apresentando uma população de partículas homogênea, enquanto que valores elevados de Pdi estão geralmente associados a uma ampla distribuição de tamanhos ou mesmo à existência de várias populações (Gaumet et al., 2008).

O potencial zeta é uma medida indireta da estabilidade física das partículas e influencia o destino biológico dos nanotransportadores bem como a sua cinética de transporte. Quando as partículas apresentam uma carga positiva têm tendência a ser atraídas por superfícies e componentes biológicos com cargas negativas, e vice-versa (Tamjidi et al., 2013). Partículas que apresentam um potencial zeta maior ou igual que 25 mV (negativo ou positivo) são consideradas fisicamente estáveis (NanoComposix, 2013).

Na tabela seguinte apresenta-se, para os quatro nanotransportadores estudados, os resultados obtidos no que respeita as suas principais propriedades como o diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersão, e o potencial zeta. Os valores representados na Tabela 2 são referentes aos nanotransportadores diretamente provenientes do processo de síntese. Como referido na secção de material e métodos, com base nas concentrações obtidas por NTA de cada nanotransportador sintetizado, tendo-se verificado que concentração mais baixa correspondia a  $2,10 \times 10^{12}$  part/mL, todas as restantes amostras foram diluídas com meio de cultura por forma a obter-se a referida concentração. Posteriormente, para a realização dos testes de citotoxicidade, a partir destas amostras (com concentração inicial de  $2,10 \times 10^{12}$  part/mL) foram preparadas diluições decimais utilizando meio de cultura, obtendo-se 8 diluições seriadas.

**Tabela 2:** Principais propriedades (diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta) dos nanotransportadores em estudo.

Nano-transportador	Diâmetro Hidrodinâmico [nm] (n=2±DP)	Pdi	Potencial Zeta [mV] (n=2±DP)
NE1	128,50 ± 0,56	0,053± 0,0014	-19,25± 0,63
NE2	128,00 ± 2,83	0,070 ± 0,021	-15,19± 0,52
NE3	128,95 ± 2,33	0,040 ± 0,0049	-15,10± 0,66
NC1	170,90 ± 2,68	0,063± 0,023	-10,27± 0,36
NC2	180,25 ± 0,21	0,016± 0,014	-14,38± 0,63
NC3	171,25 ± 2,75	0,035± 0,025	-13,70± 0,89
NLC1	195,50 ± 14,42	0,465± 0,181	-22,84± 0,34
NLC2	147,65 ± 4,88	0,340± 0,018	-21,55± 0,55
NLC3	166,65 ± 0,92	0,420± 0,018	-17,87± 0,70
LIP1	124,65 ± 1,20	0,076± 0,0133	-3,83± 0,78
LIP2	134,15 ± 2,75	0,035± 0,0049	-7,33± 3,47

O sufixo numérico usado nas siglas dos nanotransportadores (NE, NC, NLC e LIP) enumera o número de testes realizados no estudo, ou seja, os sufixos “1” e “2” representam os nanotransportadores usados no primeiro e segundo teste de citotoxicidade respectivamente aplicado aos linfócitos e o sufixo “3” representa os nanotransportadores usados no terceiro teste de citotoxicidade aplicado aos linfócitos e aos fibroblastos 3T3.

Através da análise da Tabela 2, pode-se verificar que os nanotransportadores que apresentam um diâmetro hidrodinâmico médio maior são as nanocápsulas e os transportadores lipídicos nanoestruturados, com 174,1 nm e 169,9 nm respectivamente.

Contrariamente, os que apresentaram menor valor de diâmetro hidrodinâmico médio foram as nanoesferas com uma média de 128,5 nm e os lipossomas com uma média de 129,4 nm. Os transportadores lipídicos nanoestruturados foram aqueles que apresentaram maior discrepância de valores entre as três amostras medidas.

No que diz respeito aos índices de polidispersão, as nanocápsulas, nanoesferas e lipossomas apresentaram, para todas as amostras testadas, um valor menor que 0,1, o que indica que a distribuição de tamanho apresentada por estes pode ser considerada como unimodal e monodispersa, ou seja, a distribuição de tamanhos é, de uma forma geral, homogênea e uniforme. Por outro lado os transportadores lipídicos nanoestruturados apresentam valores de índice de polidispersão superiores a 0,1, querendo assim dizer que a distribuição de tamanho apresentado por este é uma distribuição plurimodal e polidispersa, correspondendo uma ampla distribuição de tamanho, isto é, à presença de populações de partículas. Relativamente aos valores de potencial zeta dos nanotransportadores em estudo, todos eles apresentaram valores negativos, sendo que os Lipossomas foram os nanotransportadores que apresentaram menor valor absoluto de potencial. Em oposição, os transportadores lipídicos nanoestruturados apresentaram os valores mais elevados demonstrando ser os nanotransportadores mais estáveis uma vez que o seu potencial Zeta se aproxima de -25 mV.

Para além da determinação das propriedades referidas, foram ainda facultados os valores de pH, uma vez que alterações deste parâmetro podem indicar modificações da estrutura interna dos nanotransportadores, tais como a degradação dos polímeros ou a hidrólise de lípidos, fornecendo por isso informações importantes sobre a sua estabilidade (Shaffazick & Guterres, 2003). A Tabela 3 apresenta os valores de pH para as concentrações de  $2,10 \times 10^{12}$  e  $2,10 \times 10^{11}$  part/mL, tendo a primeira sido obtida por diluição dos nanotransportadores puros em água e a segunda por diluição em meio de cultura celular. O pH foi monitorizado no dia da exposição das células aos nanotransportadores e no dia seguinte, não se verificando alterações consideráveis neste período. A diferença de valores entre as duas concentrações justifica-se pelo facto da solução contendo  $2,10 \times 10^{11}$  part/mL ter sido preparada em meio de cultura, os quais

incluem sistemas tampão na sua composição (RPMI apresenta um pH de  $7,2 \pm 0,4$  e DMEM apresenta um pH de  $7,7 \pm 0,4$ ).

**Tabela 3:** Valores de pH de soluções dos nanotransportadores em estudo com concentrações de  $2,1 \times 10^{12}$  e  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL ao longo de dois dias para os dois tipos de células utilizadas.

Nanotransportadores	$2,1 \times 10^{12}$ [part/mL]		$2,1 \times 10^{11}$ [part/mL]	
	pH dia 1	pH dia 2	pH dia 1	pH dia 2
<b>Linfócitos humanos</b>				
NE1	6,02	6,31	7,74	7,76
NE2	6,05	6,42	7,53	7,60
NE3	6,07	6,25	7,39	7,48
NC1	4,21	4,22	7,62	7,63
NC2	6,05	6,32	7,54	7,55
NC3	6,31	7,15	7,39	7,48
NLC1	4,82	5,02	7,49	7,5
NLC2	5,01	5,17	7,44	7,59
NLC3	6,02	6,04	7,27	7,34
LIP1	6,4	6,75	7,63	7,70
LIP2	6,01	6,22	7,52	7,53
<b>Fibroblastos 3T3</b>				
NE1	6,07	6,25	7,81	7,84
NC1	6,48	6,7	7,08	7,94
NLC1	5,59	6,22	7,52	7,66

O sufixo usado nas siglas representativas dos nanotransportadores (NE, NC, NLC e LIP) enumera o número de testes realizados no estudo, ou seja, os sufixos “1”, “2” e “3” representam os nanotransportadores usados no primeiro, segundo e terceiro teste de citotoxicidade respetivamente.

## **4.2 Avaliação da citotoxicidade em linfócitos segundo o método de MTT**

Como referido na introdução da presente dissertação, são ainda escassos os trabalhos publicados cujo objetivo consiste, ou que incluem, a avaliação da citotoxicidade de nanotransportadores sem substância ativa, por forma a avaliar o possível efeito do próprio nanotransportador. A maioria dos estudos realizados diz respeito à comparação da atividade citotóxica de diferentes substâncias ativas, frequentemente utilizadas como anticancerígenos, quando administradas na sua forma livre ou encapsuladas em nanotransportadores. Neste trabalho avaliou-se a citotoxicidade de diferentes nanotransportadores, utilizando ainda diferentes concentrações de cada um deles.

Após 24 horas de exposição das células primárias, linfócitos humanos, aos nanotransportadores brancos realizou-se o teste do MTT para a obtenção de dados sobre a viabilidade celular (por espectrofotometria, como descrito na seção 3.3.1 do material e métodos). A partir destes dados, para cada nanotransportador, foram construídos os respetivos gráficos utilizando o Software GraphPad Prism 6.0 para obtenção da curva de viabilidade celular e posterior cálculo do IC<sub>50</sub>.

Como referido, neste estudo os linfócitos foram expostos a oito concentrações de nanotransportadores representando diferentes densidades populacionais as quais variaram entre  $2,1 \times 10^4$  e  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL (a densidade populacional final tem em conta o fator de diluição inerente à realização do ensaio em microplacas como descrito na seção de material e métodos, assim sendo, foram testadas as seguintes densidades populacionais  $2,1 \times 10^4$  part/mL,  $2,1 \times 10^5$  part/mL,  $2,1 \times 10^6$  part/mL,  $2,1 \times 10^7$  part/mL,  $2,1 \times 10^8$  part/mL,  $2,1 \times 10^9$  part/mL,  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL e  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL). A exposição das células aos nanotransportadores permite verificar se existe uma diminuição, ou não, da viabilidade celular devido à variação da densidade populacional dos nanotransportadores brancos, inferindo assim a sua possível citotoxicidade.

Seguidamente apresentam-se os gráficos de variação da viabilidade celular em função da densidade populacional referentes às células linfócitos humanos quando estas são expostas aos nanotransportadores brancos nomeadamente nanoesferas,

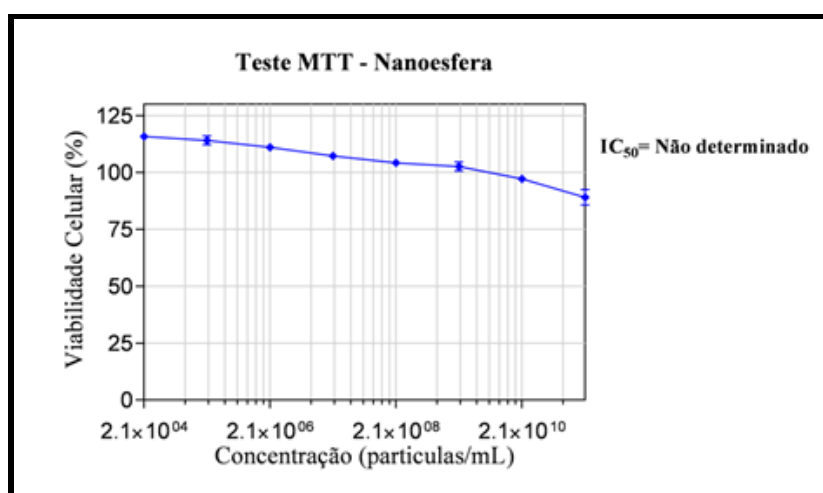
nanocápsulas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados (Figuras 22, 23, 24 e 25). Cada gráfico apresenta a média e o desvio padrão dos resultados relativos à percentagem de viabilidade celular de três ensaios independentes em que cada concentração foi testada em triplicado.

Os resultados obtidos no que respeita a citotoxicidade dos nanotransportadores foram avaliados de forma qualitativa com base na percentagem de viabilidade celular, como proposto por Oliveira (2009) e descrito na Tabela 4.

**Tabela 4:** Classificação de citotoxicidade consoante a percentagem de viabilidade celular (Oliveira, 2009).

Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)
Não-citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

O efeito das diferentes densidades populacionais de nanoesferas brancas em linfócitos humanos, obtidos após 24 horas de incubação pode ser observado na Figura 22.

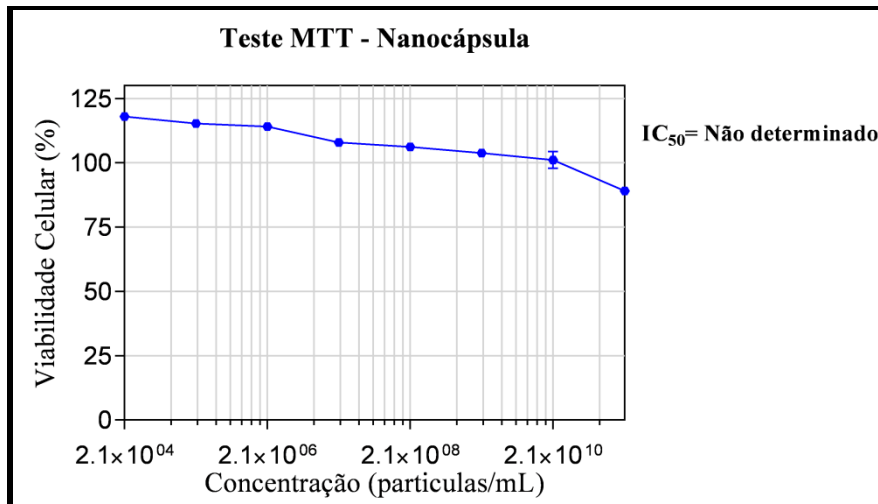


**Figura 22:** Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição às nanoesferas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.

Como se pode verificar pela curva de viabilidade celular, esta vai decrescendo à medida que o número de nanoesferas aumenta, ou seja, quanto maior a densidade populacional mais baixa é a viabilidade celular dos linfócitos. Contudo, apenas as densidades populacionais de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL apresentam uma percentagem de viabilidade celular abaixo dos 100% (média de viabilidade celular de 89,1% e 97,2%, respectivamente). Com base nos resultados obtidos e segundo a classificação apresentada na Tabela 4 verifica-se que apenas as nanoesferas brancas na concentração mais elevada (correspondendo a um número de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL) apresentam uma leve citotoxicidade e que as restantes sete concentrações são consideradas não-citotóxicas.

No gráfico representado na Figura 22 pode-se constatar que, para as concentrações inferiores de nanoesferas, verifica-se uma viabilidade celular superior a 100%. Um resultado semelhante foi obtido por López-Gasco e colaboradores (2012) em ensaios conduzidos com nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PCL), com e sem paclitaxel, obtidas pela técnica de dupla emulsão-evaporação de solvente (w/o/w). No referido trabalho, após 48h de incubação de células MCF-7 na presença de nanopartículas sem substância ativa (tendo sido testadas concentrações de nanopartículas entre 1,16-2,32 mg/mL) verificou-se igualmente um aumento significativo da viabilidade celular (atingindo  $201 \pm 3\%$ ). De igual forma, em estudos de biocompatibilidade *in vitro* de filmes de PCL realizados em fibroblastos L929, verificou-se que em curtos períodos de tempo este polímero consegue induzir, de forma significativa, uma estimulação da atividade mitocondrial, o que pode justificar o aumento de viabilidade verificada através do teste MTT (Serrano et al., 2004).

O efeito das diferentes densidades populacionais de nanocápsulas brancas em linfócitos humanos encontra-se representado na Figura 23.

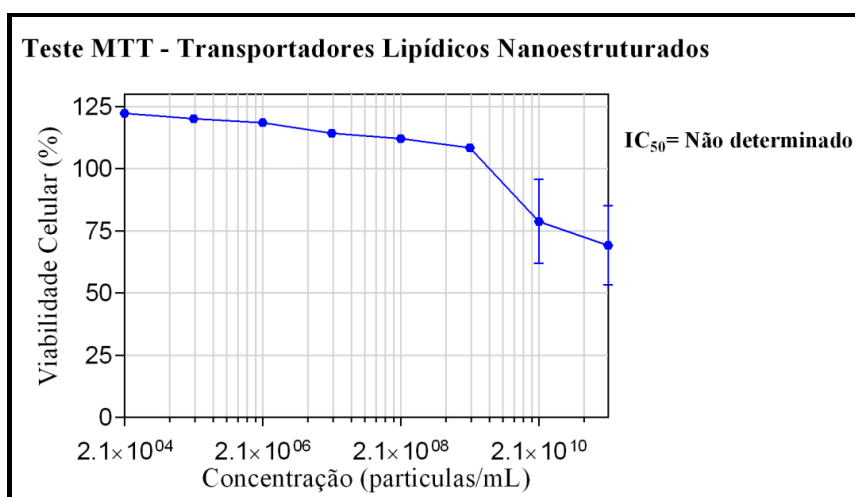


**Figura 23:** Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição às nanocápsulas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.

Como se pode observar na Figura 23, a viabilidade celular dos linfócitos diminui (de 118,1% para 89,1%) conforme a densidade populacional dos nanotransportadores aumenta, de forma semelhante aos resultados obtidos na presença das nanoesferas brancas.

Os linfócitos apresentam uma viabilidade celular inferior a 100% apenas para a concentração mais elevada, nomeadamente de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL, verificando-se um valor médio de viabilidade celular de 89,1%. Com base na Tabela 4, os resultados obtidos permitem inferir que apenas as nanocápsulas brancas na concentração superior testada apresentam uma leve citotoxicidade, sendo que as restantes sete concentrações testadas demonstraram ser não-citotóxicas nos ensaios realizados.

Os resultados da avaliação da citotoxicidade dos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos em linfócitos podem ser observados na Figura 24.

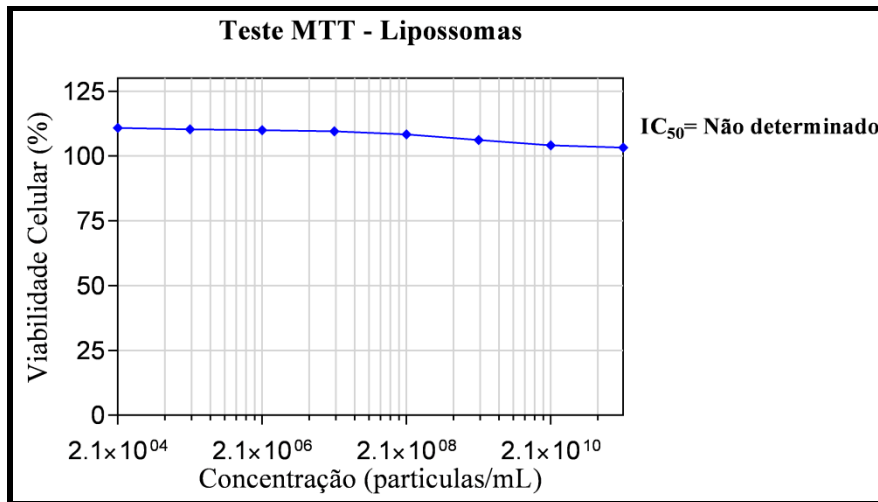


**Figura 24:** Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição aos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.

Como se pode observar na Figura 24, verifica-se que apenas para o caso das duas maiores concentrações de nanotransportadores a percentagem de viabilidade celular é menor que 100%, correspondendo nomeadamente um valor médio de 78,8% para a concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL e de 69,2% para concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL. Assim, os transportadores lipídicos nanoestruturados apresentam diferentes níveis de toxicidade conforme o número de partículas presentes no meio, demonstrando ser levemente citotóxico para a concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL e moderadamente citotóxico para a concentração superior testada. Nas restantes seis concentrações inferiores os transportadores lipídicos nanoestruturados não apresentaram citotoxicidade. No gráfico representado na Figura 24 pode-se observar a ocorrência de alguma variabilidade, demonstrada pelas barras de erro, para os resultados obtidos relativamente às duas concentrações superiores testadas. Tal poderá estar relacionado com as propriedades dos NLC apresentadas na Tabela 2, na qual se pode verificar que os NLC foram os nanotransportadores que apresentaram uma maior variabilidade de tamanho hidrodinâmico médio, verificando-se igualmente índices de polidispersão superiores, comparativamente aos restantes nanotransportadores.

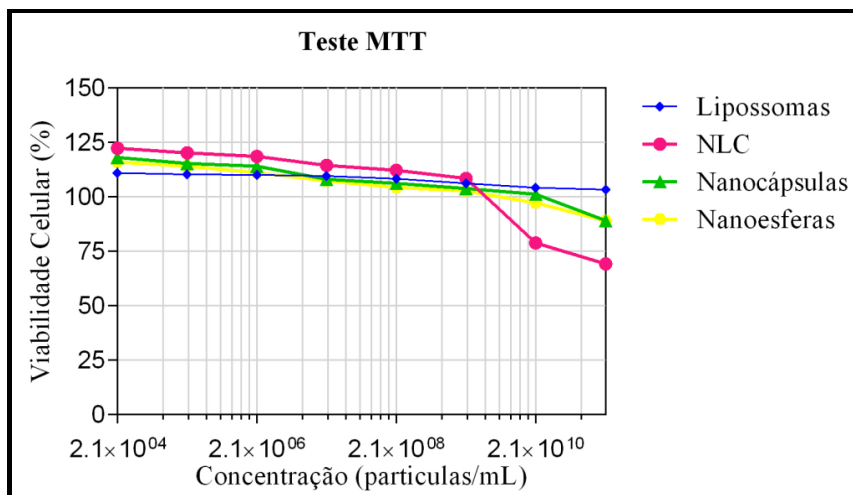
Por último, apresenta-se o gráfico referente ao ensaio da avaliação de citotoxicidade de lipossomas brancos em linfócitos (Figura 25). Apesar de a viabilidade

celular decrescer de 110,9% a 103,3% com o aumento da densidade populacional, os lipossomas não apresentaram citotoxicidade para nenhuma das oito concentrações em estudo. Este resultado estará possivelmente relacionado com o facto de se utilizar apenas fosfolípidos (fosfatidilcolina) e água na sua preparação.



**Figura 25:** Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição aos lipossomas brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.

A Figura 26 apresenta a globalidade dos resultados obtidos pelo teste do MTT (apenas valores médios) por forma a facilitar a comparação dos resultados de citotoxicidade para os diferentes nanotransportadores.



**Figura 26:** Viabilidade celular em linfócitos após 24 horas de exposição aos diferentes nanotransportadores brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método MTT.

Como se pode observar na Figura 26, a curva de viabilidade celular apresenta um comportamento global similar para os diferentes nanotransportadores brancos, na medida em que se verifica um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da densidade populacional. À exceção dos lipossomas, os resultados obtidos pelo método do MTT, em que os linfócitos humanos foram expostos a diferentes concentrações de nanotransportadores brancos durante 24 horas, sugerem que concentrações elevadas de determinados nanotransportadores podem por si só exercer uma leve a moderada citotoxicidade, uma vez que se observou uma diminuição da viabilidade celular nas duas maiores concentrações testadas, com maior ênfase na concentração mais elevada.

O efeito da concentração de nanopartículas de co-polímero de ácido polilático poliglicólito (PLGA 50:50) contendo albumina, com diâmetro médio de 100 nm, no uptake celular de células Caco-2 foi anteriormente estudado por Desai e colaboradores (1997), tendo sido demonstrado uma maior absorção de nanotransportadores por parte das células Caco-2 quando a concentração das partículas aumentou de 100  $\mu\text{g/mL}$  até 500  $\mu\text{g/mL}$ , verificando-se depois uma máxima constante (efeito plateau). Desta forma, uma das possíveis explicações para os resultados obtidos no presente estudo, poderá estar relacionada com a densidade populacional de nanotransportadores a que as células são expostas. Para as concentrações superiores ( $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL),

os nanotransportadores brancos em estudo possivelmente foram mais absorvidos pelas células linfócitos humanos, o que poderá ter tido como consequência um aumento da morte celular devido ao elevado número/saturação de nanotransportadores no espaço intracelular das células.

Como referido, os lipossomas brancos (representados a azul) foram os nanotransportadores menos citotóxicos deste estudo, uma vez que não apresentam citotoxicidade em nenhuma das oito concentrações testadas, isto é, os linfócitos apresentaram uma média de viabilidade celular sempre superior a 100% independentemente das densidades populacionais em estudo. Esta ausência de citotoxicidade por parte dos lipossomas brancos pode ser justificada pelo facto de a sua constituição ser muito simples, sendo constituídos somente por água e um fosfolípido (fosfatidilcolina). Este fosfolípido é muito tolerado pelo organismo, uma vez que é encontrado em quase todas as células do nosso organismo fazendo parte integral da maioria das membranas biológicas (Chorilli et al., 2007). Assim sendo, poder-se-á inferir que para além da concentração de partículas a que as células são expostas, a sua composição, e/ou possivelmente outros fatores, poderá exercer alguma influência na viabilidade celular, uma vez que para a mesma densidade populacional ( $2,1 \times 10^{11}$  part/mL) os lipossomas, contrariamente aos restantes nanotransportadores, não apresentaram citotoxicidade.

No que respeita as nanopartículas poliméricas brancas, nomeadamente nanocápsulas (representadas a verde na Figura 26) e nanoesferas (representadas a amarelo na Figura 26), apresentaram um comportamento muito idêntico, refletido em curvas de viabilidade celular semelhantes, verificando-se que apenas quando as células são expostas à concentração mais elevada de partículas em estudo ( $2,1 \times 10^{11}$  part/mL), estas apresentam uma leve citotoxicidade. Nesta concentração, as nanoesferas e nanocápsulas apresentaram valores de uma viabilidade celular média muito similares, nomeadamente de 89,09% e 89,07%, respectivamente.

As nanoesferas e nanocápsulas brancas utilizadas neste trabalho apresentam uma composição igual, diferindo apenas na adição do óleo na formulação das nanocápsulas brancas. Sendo assim, a utilização do óleo na preparação das nanocápsulas aparentemente não provoca alterações na citotoxicidade do nanotransportador branco

como se pode verificar pelas semelhanças entre as curvas de viabilidade celular referentes a estes dois nanotransportadores. Assim sendo, o óleo designado por Captex® 355 pode ser considerado como não tóxico para os linfócitos nas oito densidades populacionais em estudo. De facto o óleo Captex® 355 consiste num triacilglicerol constituído maioritariamente por ácido cáprico e caprílico, frequentemente utilizado nas indústrias agro-alimentares e farmacêutica.

No que respeita aos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos (representados a cor de rosa) estes foram os que apresentaram resultados mais baixos de viabilidade celular, nomeadamente 78,8% para concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL e 69,2% para a concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL. Sendo assim, qualitativamente este nanotransportador branco apresenta uma leve a moderada citotoxicidade dependendo da concentração utilizada. Através do teste do MTT e pela observação do gráfico da Figura 26, torna-se evidente que, para as mesmas concentrações de nanotransportadores, os NLC foram os que apresentaram maior citotoxicidade para as células em estudo, os linfócitos humanos. Tal poder-se-á dever a fatores diversos tais como a sua diferente composição ou a alguma propriedade característica, como o tamanho. No que respeita a sua composição, é de referir que os NLC integram Poloxamer 188 na sua formulação. De uma forma geral, considera-se que o modo de atuação biológica dos poloxamers reside sobretudo na sua capacidade em se incorporarem nas membranas celulares, permitindo a translocação para o interior das células, podendo afetar assim diversas funções celulares, como a respiração mitocondrial, síntese de ATP, expressão genética, entre outros (Zhang et al., 2010). Segundo Yan e colaboradores (2010) a adição de poloxamer 188 em formulações de nanopartículas de PLGA, comparativamente a partículas idênticas mas sem este composto, induzem uma diminuição do diâmetro médio das partículas e um aumento da sua absorção por células de cancro da mama. Resultados similares foram descritos por Zhang e colaboradores (2010) em partículas de PCL. Por outro lado, diversos estudos têm descrito a influência do tamanho de nanopartículas na sua atividade citotóxica. Bhattacharjee e colaboradores (2012) realizaram estudos utilizando partículas com 38 e 48 nm (consideradas partículas com tamanho pequeno) e partículas com 118 e 535 nm (consideradas partículas com tamanho maior), demonstrando que partículas com menores tamanhos induzem maior

citotoxicidade do que as partículas maiores. Ao analisar as propriedades dos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos (Tabela 2) pode-se verificar que estes apresentam uma média de tamanho de 169,9 nm. Apesar de este ser um valor ligeiramente superior ao tamanho médio dos restantes nanotransportadores, os valores médios são de ordem de grandeza similar. Contudo, é de realçar o valor médio de índice de polidispersão dos NLC (0,41), o qual indica que a distribuição de tamanho é plurimodal, ou seja, apresenta várias populações de partículas com diferentes tamanhos, e também polidispersa (significando que existe uma ampla gama de tamanhos, desde tamanhos muito pequenos a tamanhos muito grandes). De facto os dados facultativos provenientes da análise por DLS demonstram a existência de partículas de reduzido tamanho (na ordem dos 10 nm). Estes resultados podem explicar a maior citotoxicidade verificada para os NLC. Visto que, quer a existência de partículas muito pequenas quer a presença de poloxamer 188 na formulação dos transportadores lipídicos nanoestruturados, podem resultar num aumento do uptake celular dos NLC por parte dos linfócitos humanos, e consequentemente a diminuição da viabilidade celular devido a uma saturação de partículas dentro do espaço intracelular.

Por último, refira-se que em testes de viabilidade celular é fundamental verificar a existência do  $IC_{50}$  (concentração inibitória para 50% das células), ou seja, verificar se a viabilidade celular decresce até 50% denotando uma perda de metade da população celular. Como se pode verificar pela Figura 26, nenhum dos nanotransportadores brancos apresenta  $IC_{50}$  para as oito concentrações em estudo. Contudo, para as NE, as NC e os NLC em concentrações superiores às testadas, poderá eventualmente verificar-se uma maior citotoxicidade, permitindo o cálculo do  $IC_{50}$ , pois como referido denota-se uma tendência de decréscimo da viabilidade celular à medida que a densidade populacional de nanotransportadores no meio de cultura aumenta.

### **4.3 Avaliação da citotoxicidade em células de fibroblastos 3T3 segundo o teste do corante vermelho neutro**

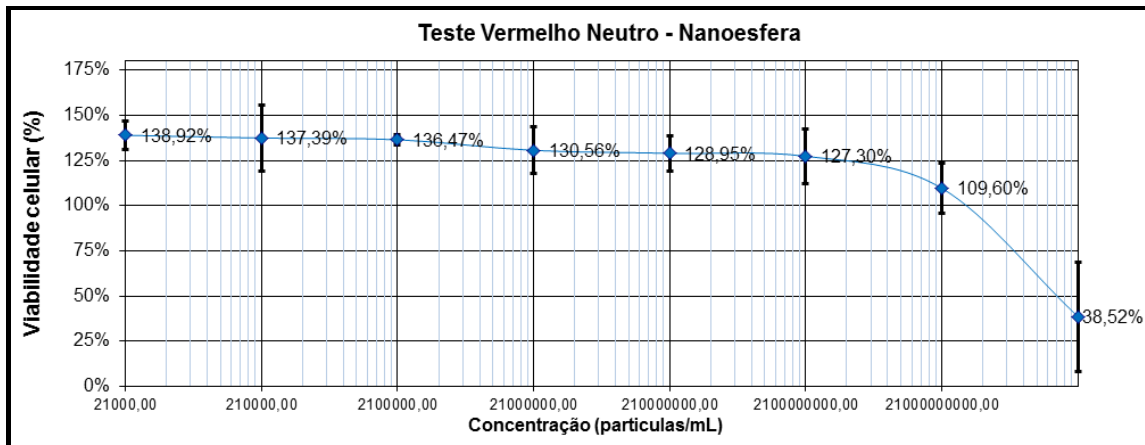
Após 48 horas de exposição das células fibroblastos 3T3 aos nanotransportadores brancos, realizou-se o teste do corante vermelho neutro para a obtenção de dados sobre

a viabilidade celular, por espectrofotômetro como descrito na seção 3.4.2. A partir destes dados, para cada nanotransportador, foram construídos os respectivos gráficos, utilizando o Microsoft Office Excel 2010 para obtenção da curva de viabilidade celular e posterior cálculo do IC<sub>50</sub>.

Neste estudo, por forma a avaliar a possível citotoxicidade de nanotransportadores em fibroblastos 3T3, procedeu-se à exposição das células a oito concentrações de nanotransportadores representando diferentes densidades populacionais as quais variaram entre  $2,1 \times 10^4$  e  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL (como referido para os linfócitos humanos, a densidade populacional final tem em conta o fator de diluição inerente à realização do ensaio em microplacas). A existência de uma diminuição de viabilidade celular pode ser verificada aquando da exposição das células a diferentes densidades populacionais de nanotransportadores brancos, inferindo-se assim a sua possível citotoxicidade.

Em seguida, apresentam-se os gráficos de variação da viabilidade celular em função da densidade populacional referente aos fibroblastos 3T3 quando expostos aos nanotransportadores brancos, nomeadamente nanoesferas, nanocápsulas e transportadores lipídicos nanoestruturados (Figuras 27, 28 e 29). Para cada um deles, foi realizada somente uma experiência em que cada concentração foi testada em sextuplicado. De referir que, com base nos resultados obtidos em linfócitos humanos neste trabalho, não se tendo verificado citotoxicidade para as concentrações testadas de lipossomas, bem como na experiência dos investigadores do Laboratório Farmatec (Universidade de Goiás, Brasil) proveniente de trabalhos anteriores e a decorrer atualmente, optou-se por não realizar ensaios com os lipossomas em células 3T3.

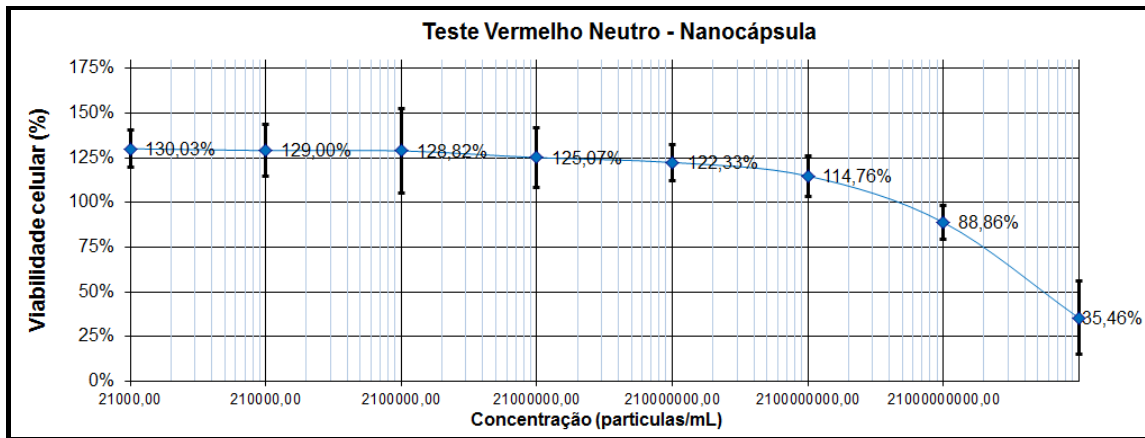
O efeito das diferentes densidades populacionais de nanoesferas brancas em fibroblastos 3T3, obtidos após 24 horas de incubação, pode ser observado na Figura 27.



**Figura 27:** Viabilidade celular em fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de exposição às nanoesferas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método do corante vermelho neutro.

Como se verifica na Figura 27, apenas para a concentração superior, nomeadamente de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL, verifica-se uma percentagem de viabilidade celular inferior a 100%, verificando-se um valor de viabilidade celular de 38,5%. Com base nos resultados obtidos e consoante a classificação apresentada na Tabela 4, verifica-se que apenas as nanoesferas brancas na concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL apresentam uma severa citotoxicidade, sendo as restantes sete concentrações consideradas não citotóxicas.

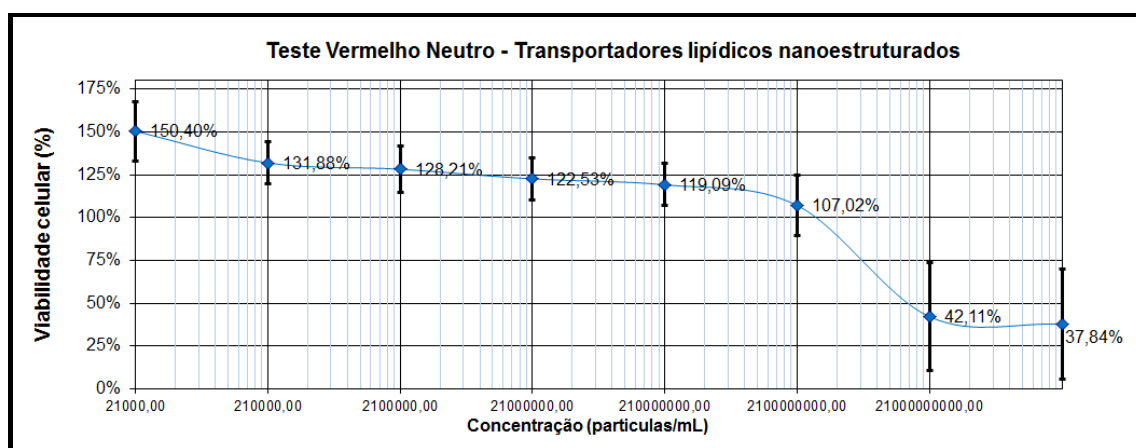
O efeito das diferentes densidades populacionais de nanocápsulas brancas em fibroblastos 3T3 encontra-se representado na Figura 28.



**Figura 28:** Viabilidade celular em fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de exposição às nanocápsulas brancas com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método do corante vermelho neutro.

O gráfico da Figura 28 denota a obtenção de valores similares para as concentrações inferiores, ocorrendo um decréscimo na viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 para as concentrações mais elevadas, consoante o aumento das densidades populacionais dos nanotransportadores. Os fibroblastos 3T3 apresentam uma viabilidade celular inferior a 100% para as duas maiores concentrações de nanotransportadores, nomeadamente um valor de 35,5% para a concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e de 88,9% para a concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL. Com estes resultados e com base na Tabela 4 verifica-se que as nanocápsulas brancas na concentração superior testada apresentam uma severa citotoxicidade e na segunda concentração superior apresentam uma leve citotoxicidade. As restantes seis concentrações testadas demonstraram ser não citotóxicas.

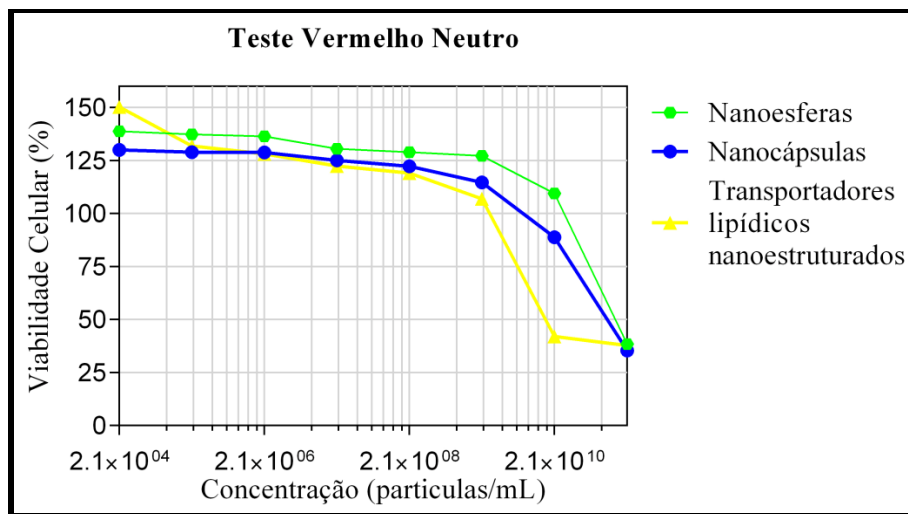
Por fim, apresenta-se o gráfico referente ao teste de avaliação de citotoxicidade dos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos em fibroblastos 3T3 (Figura 29).



**Figura 29:** Viabilidade celular em fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de exposição aos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método do corante vermelho neutro.

Como se pode verificar pela observação da Figura 29, verifica-se que apenas para o caso das duas concentrações superiores de nanotransportadores a percentagem de viabilidade celular é inferior a 100%, nomeadamente um valor de 37,8% para a concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e de 42,1% para a concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL à semelhança do verificado nos linfócitos, e em particular para as duas concentrações superiores, pode-se observar a existência de alguma variabilidade nos resultados obtidos traduzida pelas barras de erro. Contudo, considerando os valores médios obtidos, os transportadores lipídicos nanoestruturados para essas duas concentrações testadas apresentam uma severa citotoxicidade para os fibroblastos 3T3, enquanto que as restantes seis concentrações testadas demonstraram ser não citotóxicas.

A Figura 30 apresenta a globalidade dos resultados obtidos pelo teste do vermelho neutro (valores médios), por forma a facilitar a comparação dos resultados de citotoxicidade obtidos para os diferentes nanotransportadores.



**Figura 30:** Viabilidade celular em fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição aos nanotransportadores brancos com oito densidades populacionais diferentes, avaliada pelo método corante vermelho neutro.

Como se pode observar na Figura 30 e como já referido, a viabilidade celular, para os três nanotransportadores brancos, apresenta um comportamento global similar, na medida em que se verifica um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da densidade populacional. De entre a gama de concentrações testadas não se verificou reduções consideráveis na viabilidade celular até à concentração de  $2,1 \times 10^9$  part/mL. Essa redução começou a ser evidente na concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL, acentuando-se na concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL, registando-se um decréscimo considerável de viabilidade celular após as 48 horas de exposição.

Os resultados obtidos pelos nanotransportadores brancos quando os fibroblastos são expostos a estes são similares aos apresentados para os linfócitos humanos, uma vez que as curvas de viabilidade celular comportam-se de modo similar para ambos os casos. De facto em ambos os ensaios (com diferentes células) se observou a ocorrência de uma diminuição de viabilidade celular para as concentrações superiores testadas, o que sugere que em elevado número os nanotransportadores podem por si mesmos induzir fenómenos de citotoxicidade. Refira-se ainda que, comparativamente com os ensaios em linfócitos, nos ensaios realizados com fibroblastos 3T3 se verificaram valores de viabilidade celular menores, o que possivelmente é provocado pelo tempo de exposição ter sido superior a 24 horas (48 horas), como preconizado internacionalmente

(OECD, 2010). Outro possível fator que explica a redução da viabilidade celular em comparação com o ensaio dos linfócitos humanos poderá ser o facto de as células em estudo serem distintas e possivelmente de possuírem características e mecanismos de ação celular diferentes.

Em resumo, através do teste do vermelho neutro verificou-se a existência de citotoxicidade associada à utilização de nanotransportadores brancos em diferentes concentrações, com base no decréscimo de viabilidade celular de fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição. Os valores de IC<sub>50</sub> calculados para os transportadores lipídicos nanoestruturados, nanocápsulas e nanoesferas foram respetivamente  $1,59 \times 10^{10}$  part/mL,  $1,12 \times 10^{11}$  part/mL e  $4,13 \times 10^{11}$  part/mL, denotando uma maior citotoxicidade associada aos primeiros.

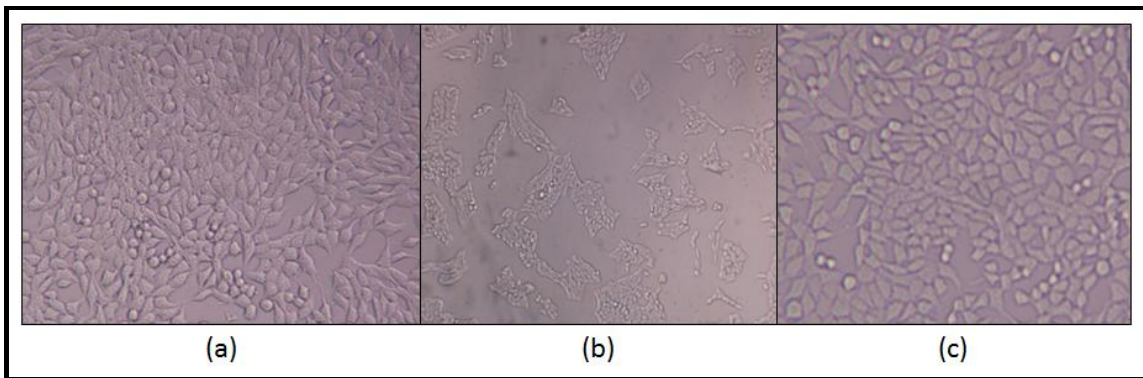
#### **4.4 Morfologia celular**

Após a realização dos ensaios descritos no ponto anterior, procedeu-se à observação do efeito dos nanotransportadores brancos ao nível da morfologia de uma linha celular de fibroblastos 3T3.

As alterações morfológicas apresentadas pelos fibroblastos 3T3 após exposição 48 horas aos nanotransportadores brancos (NE, NC e NLC) podem ser observadas, respetivamente, nas Figuras 31, 32 e 33, as quais, foram obtidas por microscopia invertida. Em toda a gama de concentrações testada (de  $2,1 \times 10^4$  part/mL até  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL) só se verificou um certo grau de citotoxicidade, ou seja, uma percentagem de viabilidade celular consideravelmente mais baixa nas concentrações de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL. Sendo assim, apenas estas duas concentrações foram utilizadas para avaliar a existência de eventuais modificações da morfologia celular dos fibroblastos 3T3.

Assim, cada figura apresenta o controlo e as duas concentrações superiores testadas, nomeadamente de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL, relativas a cada nanotransportador branco (NE, NC e NLC).

A Figura 31 evidencia as alterações morfológicas dos fibroblastos 3T3 provocadas pelas nanoesferas brancas, quando observadas ao microscópio invertido.



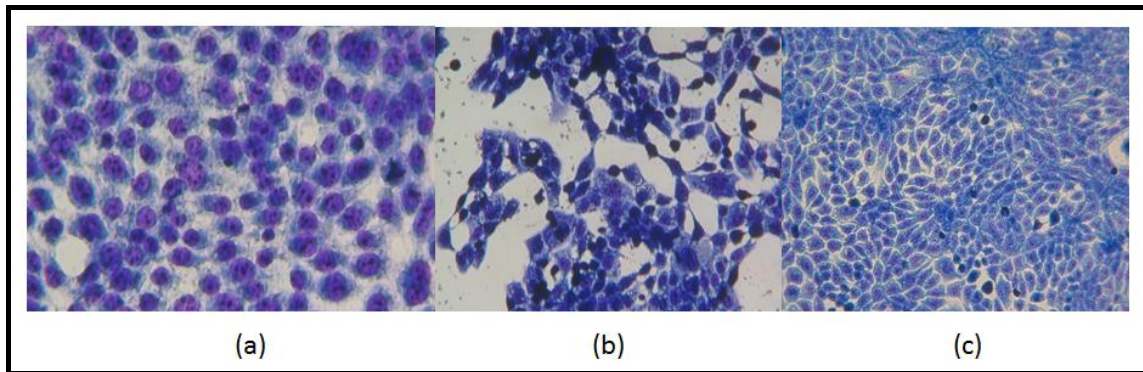
**Figura 31:** Morfologia dos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observado com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NE observada com uma objetiva de 40×, (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NE observada com uma objetiva de 20×.

Como se pode observar, verifica-se que apenas para o caso da concentração de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL as nanoesferas brancas provocam severas alterações na morfologia celular dos fibroblastos 3T3. Na Figura 31 (b), é evidente a ocorrência de modificações na forma celular bem como a redução do volume dos fibroblastos 3T3, perdendo-se assim a sua morfologia característica. Os fibroblastos 3T3 perderam a sua forma fusiforme típica, tornando-se mais achatados, mais pequenos e irregulares e a sua confluência celular diminuiu consideravelmente para menos de 50%. Na Figura 31 (c), verifica-se que para a concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL a confluência celular é superior em relação à concentração anterior, não sendo visíveis alterações significativas na morfologia celular nem redução da confluência dos fibroblastos 3T3 em relação ao controlo, Figura 31 (a).

Após visualização ao microscópio invertido, procedeu-se à coloração das amostras através da incorporação do corante Instant Prov, por forma a aumentar o contraste contribuindo assim para uma melhor elucidação dos componentes celulares. O Instant Prov é um corante rápido, constituído por três corantes: ácido, básico e neutro. Assim, consegue-se visualizar as estruturas das células através das variações de afinidade dos corantes em causa para essas estruturas e assim melhorar a visualização dos componentes da célula.

As alterações morfológicas apresentadas pelos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição às nanoesferas brancas e após incorporação ao corante Instant Prov podem ser observadas na Figura 32, onde se apresenta as imagens obtidas por microscopia

invertida para o controlo e as duas concentrações mais elevadas ( $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL).

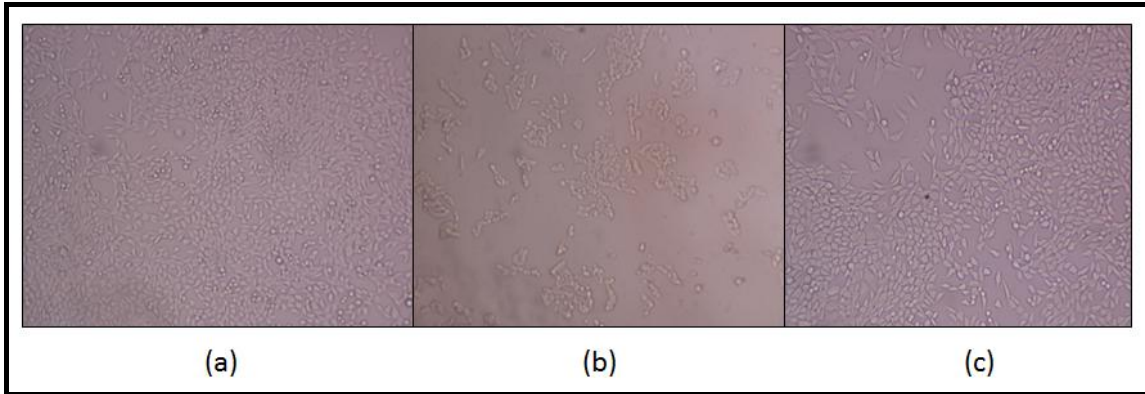


**Figura 32:** Incorporação do corante Instant Prov nas células dos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20 $\times$ , (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NE observada com uma objetiva de 20 $\times$ , (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NE observada com uma objetiva de 20 $\times$ .

Na Figura 32 pode-se visualizar as estruturas dos fibroblastos 3T3 diferentemente coradas com o corante Instant Prov conforme a sua afinidade, destacando-se o citoplasma com uma coloração azulada e o núcleo com uma coloração rósea/lilás. Na Figura 32 (b), observa-se que o núcleo e o citoplasma apresentam uma coloração carregada, denotando-se um aumento do volume do citoplasma, sendo evidente a ocorrência de alterações na morfologia celular em relação ao controlo. É ainda visível a presença de alguns resíduos celulares, evidenciando a morte celular dos fibroblastos 3T3, que se traduz na observação de uma diminuição de aproximadamente 50% da confluência celular. Estes resultados estão de acordo com o verificado no teste de citotoxicidade pelo corante vermelho neutro, nos quais se obteve uma redução média de 38,5% de viabilidade celular (Figura 22). De igual forma, verifica-se que os resultados obtidos para a densidade populacional de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL (Figura 33 (c) e Figura 34 (c)) corroboram os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular (97,2%), uma vez que se observa uma confluência celular e morfologia idênticas ao controlo.

Os resultados das alterações morfológicas dos fibroblastos 3T3 provocadas pelas nanocápsulas brancas podem ser observados na Figura 33, sendo visível que as

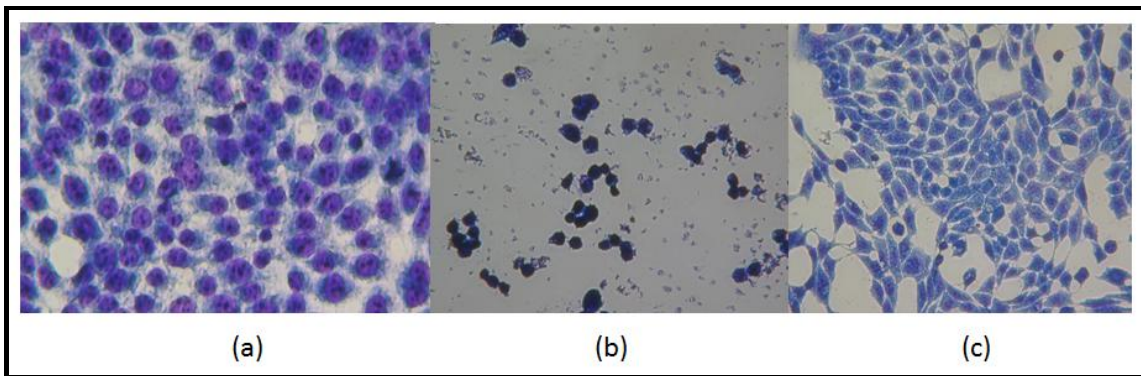
nanocápsulas brancas provocam alterações na morfologia celular e número de células para as duas concentrações mais elevadas ( $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL).



**Figura 33:** Morfologia das células fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20 $\times$ , (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20 $\times$ , (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20 $\times$ .

Pela observação da Figura 33 (b), verifica-se a ocorrência de alterações na forma celular e redução do volume dos fibroblastos 3T3, os quais perdem a sua morfologia característica. Estas alterações traduzem-se na perda da sua forma fusiforme típica, tornando-se as células mais achatadas, pela redução das dimensões dos fibroblastos 3T3, tornando-se ainda mais pequenos, e pela diminuição da confluência celular em mais de 50%. Na Figura 33 (c), observa-se apenas um decréscimo pouco considerável na confluência celular comparativamente ao controlo, Figura 33 (a), não se verificando alterações significativas da forma típica das células.

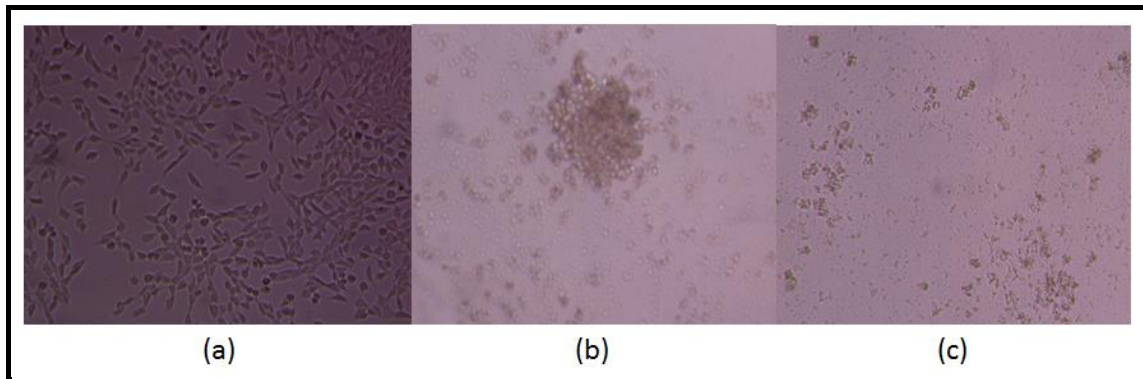
A figura 34 evidencia as alterações morfológicas apresentadas pelos fibroblastos 3T3 após as 48 horas de exposição às nanocápsulas brancas e após incorporação ao corante Instant Prov.



**Figura 34:** Incorporação do corante Instant Prov nas células dos fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20 $\times$ , (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20 $\times$ , (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NC observada com uma objetiva de 20 $\times$ .

A Figura 34 (b), denota a existência de morte celular dos fibroblastos 3T3, que se traduz numa relação na confluência celular superior a 50%. É ainda visível a ocorrência de alterações na morfologia celular em relação ao controlo. As células apresentam-se com citoplasma reduzido e intensamente coradas de cor escura, observando-se ainda a presença de resíduos e restos celulares. Estes resultados vão de encontro com o verificado no teste de citotoxicidade pelo corante vermelho neutro, no qual se obteve uma viabilidade celular média de 35,5% (Figura 28). De igual forma, para a concentração de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL, (Figura 33 (c) e 34 (c)) verifica-se a coerência de resultados com os obtidos no teste de viabilidade celular (88,7%), uma vez que se verifica uma redução pouco considerável de confluência celular em relação ao controlo. Por último, apresentam-se as alterações morfológicas dos fibroblastos 3T3 provocadas pelos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos (Figura 35). Como se pode observar, os NLC brancos provocam alterações morfológicas acentuadas para as concentrações de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL e  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL. Em ambos os casos as células apresentam uma perda da sua forma fusiforme típica, uma redução muito acentuada na confluência celular, uma redução do tamanho e uma considerável irregularidade em relação ao controlo (Figura 35 (a)). Adicionalmente verifica-se a presença de resíduos e células destruídas (Figuras 35 (b) e (c)). No caso particular dos transportadores lipídicos nanoestruturados brancos não se apresentam as imagens relativas à coloração com o

corante InstantProv devido a problemas na coloração, não tendo havido a possibilidade de repetir o ensaio.



**Figura 35:** Morfologia das células fibroblastos 3T3 após 48 horas de exposição: (a) ao meio de cultura observada com uma objetiva de 20×, (b) à densidade de  $2,1 \times 10^{11}$  part/mL de NLC observada com uma objetiva de 40×, (c) à densidade de  $2,1 \times 10^{10}$  part/mL de NLC observada com uma objetiva de 20×.

## QUINTO CAPÍTULO

### **Conclusões e Trabalhos Futuros**

O objetivo desta dissertação consistiu em avaliar a citotoxicidade de diferentes tipos de nanotransportadores sem substância ativa (designados como brancos) com diferentes densidades populacionais, utilizando culturas celulares de linfócitos humanos e fibroblastos 3T3 são expostos a estes.

Após exposição dos linfócitos humanos aos diferentes nanotransportadores brancos avaliados, verificou-se um comportamento similar face a todas as partículas estudadas, o qual se traduziu na obtenção de curvas de viabilidade celular idênticas as quais permitiram concluir que com um aumento da densidade populacional dos nanotransportadores a percentagem de viabilidade celular vai decrescendo. À exceção dos lipossomas, verificou-se de uma forma geral que, para as concentrações mais elevadas, os nanotransportadores brancos apresentam citotoxicidade leve a moderada, verificando-se uma diminuição da viabilidade celular dos linfócitos. Dos quatro nanotransportadores brancos, os transportadores lipídicos nanoestruturados foram aqueles que apresentam uma percentagem de viabilidade celular mais baixa (69,2%). Os valores obtidos sugerem que, possivelmente, os nanotransportadores brancos apresentariam uma maior citotoxicidade caso o tempo de exposição das células aos nanotransportadores fosse superior a 24 horas e/ou caso a concentração de partículas aumentasse, ou seja, fosse superior a  $2,1 \times 10^{12}$  part/mL, permitindo possivelmente realizar os cálculos dos valores de  $IC_{50}$  e, futuramente obter, valores de  $LD_{50}$ .

No que respeita os fibroblastos 3T3, estes apresentaram uma curva de viabilidade celular idêntica para os três nanotransportadores brancos avaliados, observando-se um decréscimo com o aumento da densidade populacional (partículas/mL). Em todos os casos, a concentração mais elevada dos nanotransportadores brancos apresentou uma severa citotoxicidade para os fibroblastos 3T3 observando-se uma diminuição da viabilidade celular, tendo-se obtido valores de  $IC_{50}$  de  $1,12 \times 10^{11}$  part/mL para as nanocápsulas,  $4,13 \times 10^{11}$  part/mL para as nanoesferas e  $1,59 \times 10^{10}$  part/mL para os

transportadores lipídicos nanoestruturados. De entre os diferentes nanotransportadores, os transportadores lipídicos nanoestruturados foram os que apresentam valores de citotoxicidade mais elevados para as duas densidades populacionais superiores, apresentando valores de viabilidade celular mais baixos (37,8% e 42,1%). Os valores obtidos demonstram que, para concentrações elevadas, os nanotransportadores *per se* podem apresentar citotoxicidade, podendo não ser inócua a sua utilização. Tal poderá ser vantajoso em determinado tipo de utilizações, no qual se pretende que estes transportadores exerçam ação citotóxica, por exemplo quando encapsulam fármacos antineoplásicos, podendo potenciar o seu efeito. Contudo esta acção citotóxica poderá relacionar-se não somente com a concentração (número de partículas/mL) mas também com o seu tamanho e composição química.

A avaliação microscópica da morfologia apresentada pelos fibroblastos 3T3 após exposição aos nanotransportadores confirmou os resultados obtidos pela realização do teste de citotoxicidade do corante vermelho neutro, uma vez que, para as duas concentrações mais elevadas, dos três nanotransportadores brancos em estudo, verificou-se a ocorrência de citotoxicidade, traduzida no decréscimo de percentagem de viabilidade. A morfologia apresentada pelos fibroblastos 3T3 após a exposição ao corante Instant Prov demonstra que, para as duas concentrações mais elevadas, os componentes celulares apresentam alterações morfológicas demonstrando mais uma vez, a existência de citotoxicidade provocada pelos nanotransportadores brancos.

Esta dissertação, tratando-se de um estudo preliminar, representa o início de um mundo de possibilidades por explorar, sendo vários os trabalhos que seria interessante realizar na continuidade deste trabalho, nomeadamente:

Realizar novos ensaios com tempo de exposição dos linfócitos humanos aos nanotransportadores brancos de 48 e 72 horas, possibilitando a verificação de existência, ou não, de um aumento de citotoxicidade tempo-dependente;

Como preconizado por alguns autores, experimentar outros tipos de testes de citotoxicidade nos linfócitos humanos e nos fibroblastos 3T3, de modo a poder-se comparar os resultados de viabilidade celular;

### *Conclusões e Trabalhos Futuros*

Modificar o tempo de exposição dos fibroblastos 3T3 aos nanotransportadores brancos para 24 horas para comparação com os resultados obtidos (48h), e para 72 horas possibilitando a verificação de existência ou não de um aumento de citotoxicidade;

Refazer estes testes noutros tipos de células, tais como hepatócitos e macrófagos, permitindo verificar a existência ou não de citotoxicidade por parte dos nanotransportadores brancos em diferentes tipos de células.

Com base nos dados obtidos, prosseguir os ensaios com vista a conseguir estimar valores de LD<sub>50</sub> e posteriormente realizar testes *in vivo* em murganhos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen J. G., Bloxham D. P. (1989). The pharmacology and pharmacokinetics of the retinoids. *Pharmacology e therapeutics*, 40:1-27.

Aoki H., Tsuneaki T., Sakurai F., Fuji K., Miyajima K. (1997). Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition Kinetics of liposomes in rats. *Internacional journal of pharmaceutics*, 156:163-174.

Araújo J., Gonsalez E., Egea M. A., Garcia M. L., Souto E. B. (2009). Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drugs delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5:394-401.

Araújo K.C.F., Pazini F., Valadares M. C., Oliveira V. (2012). Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier, Brazil.

Azevedo M. M. M. (2002). Nanoesferas e liberação controlada de fármacos. Monografia do Instituto de Química-UNICAMP, Campinas, Brasil.

Batista C. M., Carvalho C. M. B., Magalhães N. S. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado de arte. *Revista de Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43:167-179.

Bhattacharjee S., Ershov D., Fytianos K., Gucht J. V., Alink G. M., Rietjens I. M. C. M., Marcelis A. T. M., Zuilhof H. (2012). Cytotoxicity and celular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with diferente size and surfasse characteristics. *Particle and Fibre Toxicology*, 9:1-19.

Borenfreund E., Puerner J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Journal Toxicol let*, 24:119-124.

Boulton M. (1990). Cell culture. *Eye*, 4:622-631.

Calder P. C. (1998). Dietary fatty acids and lymphocytes functions. *Proccedings of the Nutrition Society*, 57:487-502.

Chawla J. S., Amiji M. M. (2002). Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International journal of pharmaceutics*, 249:127-138.

Chapdelaine M. S. (2010). MTT reduction – a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. *Pharmakon Research International*, 1-6.

Chorilli M., Rimério T. C., Oliveira A. G., Scarpa M. V. (2007). Estudo da estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26:31-37.

Couvreur P., Barrat G., Fattal E., Legrand P., Vauthier C. (2002). Nanocapsule technology: a review, *Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19:99-134.

Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 41:2-13.

Cruz Enes M, Pereira M, Dourado M, Ribeiro A, B., S. (2009). Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. *Revista portuguesa de pneumologia*, 15:670-674.

Danguano J. K. M. F., Santos C., Rogero S. O. (2007). Avaliação da citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Matéria*, 12:134-139.

Date A. A., Joshi M.D., Patravale V. B. (2007). Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59:505–521.

Denizot F., Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89:271-277.

Desai M. P., Labhasetwar V., Walter E., Levy R. J., Amidon G. L. (1997). The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14:1568-1573.

Dias D. J. S. (2013). Caracterização físico-química, morfologia e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF – 7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil. Tese de mestrado em Ciências Sociais da Universidade de Brasília, Brasil.

Diniz D. G. A. (2008). Obtenção, caracterização e avaliação da citotoxicidade sobre células neoplásicas da isotretinoína encapsulada em lipossomas e nanocápsulas poliméricas. Tese de mestrado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasil.

Diniz D. G. A., Alves C. P. I., Castro N. C., Rodovalho L. F. F., Benfica P. L., Valadares M. C., Lima E. M. (2008). Isotretinoin-containing liposomes: obtention, characterization and in vitro cytotoxicity on leukemia cells. *Applied Cancer Research*, 28:106-112.

Domb A.J., Kumar N., Sherskin T., Betonila A., Stager J., Teomim D. (2002). Biodegradable polymers as drug carrier systems. In: Dimitriu, S. *Polymeric Biomaterials*. 2a Edição, Marcel Dekker. Basel, Switzerland.

Edwards K. A., Baeumner A. J. (2006). Liposomes in analyses. *Talanta*, 68:1421-1431.

Eidi H., Joubert O., Attik G., Duval R. E., Bottin M. C., Hamouia A., Maincent P., Rihm B. H. (2010). Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 396:156-165.

Fatal V., Eugénio J. (2010). Evolução da nanotecnologia abordagem nacional e internacional. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 1-4.

Freshney, R. I. (2010). Culture of animals Cells – a manual of basic technique and specialized applications.

Gaumet M., Vargas A., Gurny R., Delie F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69:1– 9.

Graulab. (2013). Testes para avaliação de citotoxicidade in vitro. URL: <http://www.graulab.com.br/kitdiagnostico/catalogo/Documenta%C3%A7%C3%A3o%2>

OT%C3%A9cnica%20IN%20CYTOTOX/IN%20CYTOTOX%20Catalogo%20eletronic%20-%20Port%201.5.pdf. Consultado em 16 de Setembro de 2013.

Gregoriadis G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Tibtech December*, 13:527-537.

Guimarães K. L., Ré M. I. (2011). Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: the first (SLN) and the second generation (NLC). *Nanocosmetics and nanomedicines*, 101-107.

Hartung T., Balls M., Bardouille C., Blanck O., Coecke S., Gstraunthaler G., Lewis D. (2002). ECVAM good cell culture practice task force report 1. *Atlas*, 30:407-414.

Hoffbrand A. V., Moss P.A.H., Pettit J. E. (2013). Fundamentos em Hematologia. *Artmed*, 5:118-119.

Hughes G. A. (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Journal Nanomedicine*, 1:22-30.

Jacob V. P. (2011). Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 $\beta$ -estradiol. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade da Covilhã, Portugal.

Kingsley J. D., Dou H., Morehead J. (2006). Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal Neuroimmune Pharmacol*, 1:340-350.

Kroll A., Pillukat M. H., Hahn D., Schnekenburger J. (2009). Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72:370-377.

Liu Y., Peterson D. A., Kimura H., Schubert D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal Neurochem*, 69:581-593.

Macato P. D. (2009). Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista eletrônica de farmácia*, 6:1-37.

Mattos A. C. (2013). Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas PLA e PLA-PEG contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Guarapuava, Brasil.

Mihranyan A., Ferraz N., Stromme M. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in materials science*, 57:875-910.

Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 385:113-142.

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

Muller R. H., Shegokar R., Keck C. M. (2011). 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Current Drug Discovery Technologies*, 8:207-227.

NanoSight. (2013). URL: <http://www.nanosight.com/technology/nta-software>. Consultado em 2 de Julho de 2013.

Nascimento K., Viana A. R., Silva T. H., Alves M. P., Sagrillo M. R., Krause L. M. F. (2012). Avaliação da citotoxicidade de nanocápsulas contendo meloxicam em culturas de esplenócitos de camundongos *in vitro*. Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Santa Maria, Brasil.

NanoComposix. (2013). Zeta potential analysis of nanoparticles. URL: <http://nanocomposix.com/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20Zeta%20Potential%20Analysis%20of%20Nanoparticles.pdf>. Consultado em 12 de Setembro de 2013.

Nel A., Xia t., Madler L., Ning L. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311:622-627.

NewProv.(2013).URL:<http://www.newprov.com.br/uploads/bula/Instant%20Prov.pdf>. Consultado em 25 Junho de 2013.

Oliveira M. P. (2009). Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana. Tese de mestrado em Medicina e Ciências da Saúde da Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2010). Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 129.

Pinto C. I. S. (2011). AZT – Molécula de morte e sobrevivência celular. Tese de mestrado em Química Aplicada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal.

Prata W. M. (2011). Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadores de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Minas Gerais, Brasil.

Ravi K. M. N. (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3:234-258.

Rawat M., Singh D., Saraf S., Saraf S. (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Journal Biological & Pharmaceutical Reviews Bulletin*, 29:1790-1798.

Reis C.P., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2:8-21.

Repetto G., Del P. A., Zurira J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability / cytotoxicity. *Journal Nature Protocols*, 3:1125 – 1131.

Ryan J. A. (2008). Introduction to animal cell culture. URL: [http://download.bion.com/view/upload/month\\_0806/20080626\\_a9b77d7f680657adb5cffghuKfNAPqmK.attach.pdf](http://download.bion.com/view/upload/month_0806/20080626_a9b77d7f680657adb5cffghuKfNAPqmK.attach.pdf). Consultado em 20 de Junho de 2013.

Santos A. P., Bozinis M. C. V., Mendes L. P., Lima E. M., Paula J. R. (10 a 15 de julho de 2011). Avaliação comparativa do efeito citotóxico de lupeol e lipossomas contendo lupeol em células K-562 e curva de sobrevida. VIII Seminário de pós-graduação da UFG – doutorado, UFG – Goiânia, Brasil.

Schaffazick S. R., Guterres S. S. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26:726-737.

Serrano M. C., Pagani R., Vallet-Regí M., Peña J., Rámila A., Izquierdo I., Portolés, M. T. (2004). In vitro biocompatibility assessment of poly(E-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, 25:5603–5611.

Severino P., Andreani T., Macedo A. S., Fangueiro J.F., Santana M. H. A., Silva A. M., Souto E. B. (2011). Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. *Journal of drug delivery*, 2012:1-10.

Silva A. H. (2011). Estratégias para avaliação da toxicidade de sistemas nanoestruturados. Teses de mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

Soares M. V. (2009). Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de poli-ε-caprolactona contendo zinco(II)ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica do câncer.

Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70:1-20.

Sosnik A., Carcaboso Á. M., Glisoni R. J., Moretton M. A., Chiappetta D. A. (2010). New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62:547–559.

Stecanella L. A., Taveira S. F., Marreto R. N., Valadares M. C., Vieira M. S., Kato M. J., Lima E. M. (2013). Development and characterization of PLGA nanocapsules of grandisin isolated from *Virola surinamensis*: *in vitro* release and cytotoxicity studies. *Journal of Pharmacognosy*, 23:153-159.

Stern S. T., Mcneil S. E. (2008). Nanotechnology safety concerns revisited. *Journal Toxicological Sciences*, 101:4-21.

Takamoto R. T. O., Matuo M. C. S., Kikuchi I. S. (2012). Novos lipossomas de bixina como carreador de fármacos antineoplásicos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, Brasil.

Tamjidi F., Shahedi M., Varshosaz J., Nasirpour A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19:29–43.

Tavares A. A. S., Tavares J. M. R. S. (2009). Princípios gerais de culturas de células e citometria de fluxo para avaliação dos efeitos da radiação ionizante. Relatório interno da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.

Teixeira C. M. B. (2008). Nanopartículas poliméricas de derivados xantônicos. Tese de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

Tese de mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Todoro G. J., Green H. M. D. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of cell biology*, 17:299-313.

Valadares, M. C. (2006). Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL<sub>50</sub>”. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3: 93-98.

Van M. J., Kasper G. J., Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Molecular Biology*, 731:237- 45.

Vemuri S., Rhodes C.T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70:95-111.

Venkata V. V., Omathano P. P. (2009). Nanosystems for dermal and transdermal drug delivery. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 191:126-137.

Vicente A. M. M. (2012). Efeitos adversos de contaminantes estuarinos em células humanas: avaliação da genotoxicidade de desregulação endócrina. Tese de mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal.

Vieira M. S. (2009). Emprego da citotoxicidade basal *in vitro* na redução do número de animais em ensaios de avaliação da toxicidade oral aguda: a grandisina e seu metabolito majoritário como protótipos. Tese de mestrado em Ciências da Saúde da Faculdade Federal de Goiás, Brasil.

Yan F., Zhang C., Zheng Y., Mei L., Tang L., Song C., Sun H., Huang L. (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6:170-178.

Zhang Y., Tang L., Sun L., Bao J., Canção C., Huang L., Kexin L., Tian Y., Tian G., Zhen L., Sun H., Mei L. (2010). A novel paclitaxel-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poloxamer 188 blends nanoparticle overcoming multidrug resistance for cancer treatment. *Acta Biomaterialia*, 6:2045-2052.