



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**DIOGO MAXIMIANO BARROS FIGUEIREDO RAMOS**

***NANOTECNOLOGIAS E SAÚDE OCUPACIONAL***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE SAÚDE PÚBLICA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
MESTRE ANTÓNIO JORGE CORREIA DE GOUVEIA FERREIRA**

**[JANEIRO/2012]**

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra**

***Nanotecnologias e Saúde Ocupacional***

**Área Científica de Saúde Pública**

**Autor:** Diogo Maximiano Barros Figueiredo Ramos

**E-mail:** [jocafinte@gmail.com](mailto:jocafinte@gmail.com)

**Orientador:** Mestre António Jorge Correia de Gouveia Ferreira

Coimbra,  
Janeiro de 2012

### **Agradecimentos:**

A todos os docentes, assistentes e funcionários da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) que me ajudaram no percurso académico, em especial a todos os Senhores Professores que todos os dias nos transmitem os seus conhecimentos e continuamente fazem da FMUC uma escola de excelência;

Ao Dr. António Jorge Ferreira pela ajuda imprescindível na elaboração deste trabalho. Foi exemplar e único em toda a disponibilidade, apoio e dedicação que me prestou durante este período. Ao Dr. António Jorge devo todo o êxito e aprendizagem adquirida;

À Margarida por toda a sua ajuda e disponibilidade na conclusão dos detalhes deste trabalho.

**Índice**

<b>1- Abreviaturas.....</b>	<b>4</b>
<b>2- Resumo.....</b>	<b>5</b>
<b>3- Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>4- Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>5- Desenvolvimento.....</b>	<b>14</b>
5.1- Fontes de preocupação / Riscos para a saúde.....	14
5.2- Vias de exposição, translocação no corpo e interação com os sistemas biológicos.....	16
5.2.1- Vias de exposição.....	16
5.2.1.1- Via inalatória.....	17
5.2.1.2- Via digestiva.....	17
5.2.1.3- Via dérmica.....	18
5.2.2- Translocação no corpo e interação com os sistemas biológicos.....	19
5.3- Estudos de toxicologia com nanopartículas.....	24
5.4- Classes de nanomateriais.....	26
5.4.1- Fulerenos de carbono.....	26
5.4.1.1- Estudos <i>in vivo</i> da toxicidade dos fulerenos.....	27
5.4.1.2- Estudos <i>in vitro</i> da toxicidade dos fulerenos.....	32
5.4.1.3- Mecanismos biológicos da toxicidade dos fulerenos.....	33
5.4.2- Nanotubos de carbono.....	35
5.4.2.1- Estudos <i>in vivo</i> da toxicidade dos nanotubos de carbono.....	36
5.4.2.2- Estudos <i>in vitro</i> da toxicidade dos nanotubos de carbono.....	44
5.4.2.3- Mecanismos biológicos da toxicidade a nanotubos de carbono.....	45
5.5- Exposição ocupacional.....	48
5.5.1- Potencial para exposição ocupacional.....	48
5.5.2- Fatores que afetam a exposição a nanopartículas.....	50
5.5.3- Recomendações para o uso industrial de nanomateriais.....	51
5.5.3.1- Procedimentos de controlo da exposição.....	52
<b>6- Conclusão.....</b>	<b>59</b>
<b>7- Anexo.....</b>	<b>62</b>
<b>8- Referências.....</b>	<b>63</b>

## 1- Abreviaturas

**C<sub>60</sub>**- Fulereo de Buckminster

**C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>**- Fulerol

**CNT**- Carbon nanotube / Nanotubo de carbono

**EGFR**- Epidermal growth factor receptor / Recetor do fator de crescimento da epiderme

**ERO**- Espécie reativa de oxigénio

**HEPA**- Alta eficiência de partículas do ar

**IL-1 $\beta$** - Interleucina 1 $\beta$

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-8**- Interleucina 8

**INL**- Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia

**LDH**- Lactato desidrogenase

**MWCNT**- Multi-walled carbon nanotube / Nanotubo de carbono multicamada

**NCI**- Nanopartículas criadas industrialmente

**NIOSH**- National Institute for Occupational Safety and Health

**PEL** – Permissible exposure limits

**SWCNT**- Single-walled carbon nanotube / Nanotubo de carbono de camada simples

**TiO<sub>2</sub>**- Dióxido de Titânio

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## 2- Resumo

### Introdução

A Nanotecnologia é uma área nova e rapidamente emergente que envolve a produção e o uso de estruturas à nanoescala (1-100 nanômetros). A Nanotecnologia cresce a par de outros campos científicos que incluem a química, a biologia, a física, a ótica e a mecânica, sendo visto por muitos como a “próxima revolução industrial”.

A iminente revolução da nanotecnologia promete avanços incríveis na ciência, na tecnologia, e na sociedade no seu conjunto. Já está a surgir nos mercados a primeira geração de produtos que contêm materiais criados industrialmente à nanoescala, enquanto mais produtos sofisticados continuam a ser desenvolvidos em laboratórios por todo o Mundo.

### Objetivos

- Definir o que se entende por nanotecnologias;
- Sintetizar o atual conhecimento sobre nanotecnologias;
- Identificar aplicações específicas das novas tecnologias, em particular quando as nanotecnologias já estão em uso;
- Projetar uma visão futura de forma a perceber como é que as nanotecnologias serão utilizadas;
- Identificar que implicações ou incertezas de saúde e segurança podem surgir devido ao uso das nanotecnologias, ambas no presente e no futuro;
- Identificar as áreas onde será necessário considerar regulamentação adicional.

### Desenvolvimento

Há perspectivas muito elevadas da aplicação de nanomateriais criados industrialmente que incluem muitas áreas diferentes como a medicina e a engenharia, entre outras.

Investigadores e vários tipos de profissionais a nível industrial estão potencialmente expostos a partículas dispersáveis à nanoescala, particularmente através da via inalatória, digestiva e dérmica. Preocupações sobre os efeitos adversos e imprevisíveis na saúde humana têm sido levantadas. De facto, as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais criados industrialmente muito atrativos, numa perspectiva tecnológica e biomédica, podem também fazer destes novos materiais substâncias perigosas para a saúde humana e para o ambiente. Investigações preliminares indicam que, em alguns casos, as nanopartículas podem ser mais tóxicas do que outras formas dos mesmos materiais ou similares.

Contudo, a aplicação de ferramentas clássicas da saúde ocupacional e da higiene industrial estão dificultadas pela falta de recomendações de consenso no acompanhamento médico, avaliação e controlo da exposição a estas partículas.

### Conclusão

Nos próximos anos, haverá uma necessidade de compreender a toxicologia dos materiais cada vez mais sofisticados que exibem funcionalidades dinâmicas e multifacetadas. Caso a comunidade investigadora no campo da Toxicologia atenda aos desafios que permitam o uso seguro desta nova geração de substâncias, será necessário ir além da nanotoxicologia e em direção a uma nova toxicologia de materiais inovadores.

Neste trabalho, apresenta-se uma breve revisão do conhecimento atual da ciência sobre a toxicologia dos nanomateriais.

Palavras-chave: nanotecnologias; saúde ocupacional; fulerenos; nanotubos de carbono; nanotoxicologia; vias de exposição.

### 3- Abstract

#### Introduction

Nanotechnology is a new and fast emerging field that involves the production and use of structures at the nano-scale (1 to 100 nanometres). Nanotechnology grows out of a number of scientific fields including chemistry, biology, physics, optics, and mechanics and is seen by many as the “next industrial revolution.”

The imminent nanotechnology revolution promises dramatic advancements in science, technology, medicine and society as a whole. First generation products containing engineered nanoscale materials are already appearing in the marketplace, while more sophisticated products are being developed in laboratories around the world.

#### Objectives

- Define what is meant by nanotechnologies;
- Summarize the current state of scientific knowledge about nanotechnologies;
- Identify the specific applications of the new technologies, in particular where nanotechnologies are already in use;
- Carry out a forward look to see how the nanotechnologies might be used in future;
- Identify what health and safety implications or uncertainties may arise from the use of the nanotechnologies, both current and future;
- Identify areas where additional regulation needs to be considered.

#### Actual knowledge

There are several exciting prospects for the application of engineered nanomaterials that include many different areas like the medicine, the engineering and too many others.

Researchers and manufacturing employees are potentially exposed to dispersible nanoscale particulate matter via inhalation, ingestion and skin contact. Concerns over adverse and

unanticipated effects on human health have also been raised. In fact, the same properties that make engineered nanomaterials attractive from a technological and biomedical perspective could also make these novel materials harmful to human health and the environment. Preliminary research indicates that in some cases nanoparticulate matter may be more toxic than other forms of the same or similar material.

However, application of the classical tools of occupational medicine and industrial hygiene is hampered by the lack of consensus guidelines for medical monitoring, exposure assessment, and exposure control.

### Conclusion

Over the next years, there will be a need to understand the toxicology of increasingly sophisticated materials that exhibit dynamic and multifaceted functionality. If the toxicology community is to meet the challenge of ensuring the safe use of this new generation of substances, it will need to move beyond “nano” toxicology and toward a new toxicology of sophisticated materials.

We present a brief overview of the current state of the science on the toxicology of nanoscale materials.

Key words: nanotechnologies; occupational health; fullerenes; carbon nanotubes; nanotoxicology; exposure routes.

#### 4- Introdução

As nanotecnologias envolvem a manipulação da matéria em escala nanométrica, controlando-se para este efeito o seu tamanho e forma, produzindo-se assim novos materiais, estruturas e dispositivos. (NIOSH 2009)

Define-se um material como nanotecnológico caso este envolva todas as seguintes características:

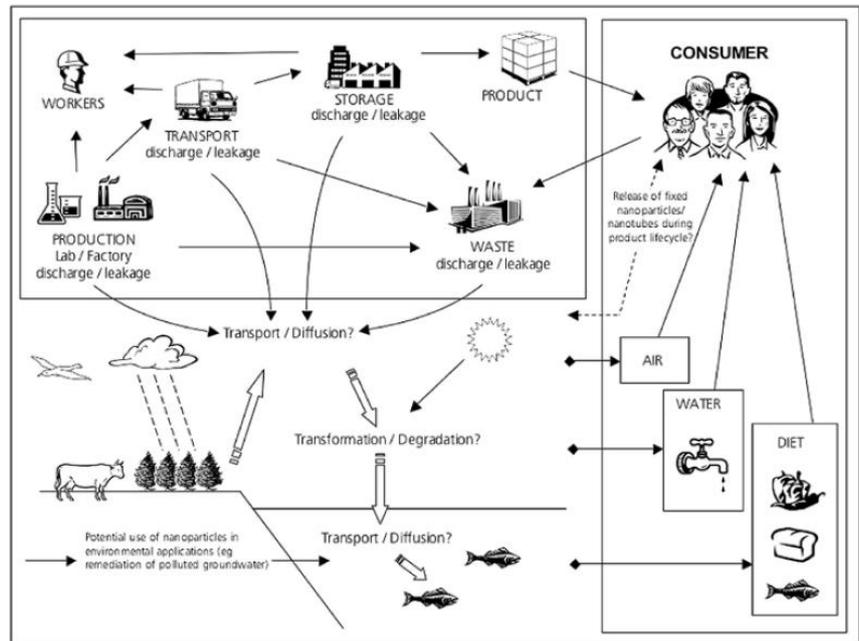
1. Investigação e desenvolvimento tecnológico que englobe estruturas com uma dimensão  $\leq 100$  nanómetros (nm), frequentemente associadas a escala atómica ou molecular;
2. Criação e utilização de estruturas, dispositivos e sistemas que têm propriedades e funções únicas devido às suas dimensões em escala nanométrica;
3. A capacidade de controlar ou manipular em escala atómica. (NIOSH 2009)

São partículas invisíveis ao olho humano e medem cerca de um milésimo da largura de um cabelo. Devido às suas propriedades únicas, como por exemplo o seu tamanho muito pequeno e a grande superfície em relação à massa, as nanotecnologias expõem os seres humanos a um novo e maior potencial de risco, levantando preocupações de saúde em especial para os trabalhadores. (NSW 2007)

Assim, as nanotecnologias apresentam muitas oportunidades e benefícios para novos materiais com propriedades significativamente melhoradas, bem como aplicações revolucionárias no campo da energia, ambiente, medicina, entre outros.

A produção industrial e o uso de nanopartículas serão a força impulsionadora no emergir de novos materiais industriais no século XXI. Em termos económicos, os analistas estimam que o mercado mundial para nanomateriais tenha sido de aproximadamente 700-1000 biliões de

euros em 2011. Contudo, o potencial impacto destes novos materiais na saúde humana e no ambiente é vista com apreensão. Algumas das nanoestruturas estão presentes no desenvolvimento de novos produtos e estão cada vez mais a suscitar interesse em várias aplicações como é o caso da eletrónica, dos materiais de suporte reforçados, dos ativadores de polímeros conjugados micro-fabricados, dos



**Figura 1-** Vias de exposição possíveis para nanomateriais baseado nas aplicações atuais e do futuro. Retirado de (Stone 2009)

aperfeiçoamento de imagens de microscopia eletrónica. As *nanopartículas criadas industrialmente* (NCI) também já estão presentes nos produtos de consumo, como são os casos dos cremes solares, cosméticos e produtos de *toilette*, que são utilizados diariamente por milhões de pessoas. É estimado que o mercado destes produtos cresça mais de oito biliões de dólares nesta década. Introduzir novos materiais na indústria requer por isso uma avaliação de segurança e uma compreensão dos impactos desses produtos no ambiente, nas espécies biológicas e na saúde humana. (Shvedova, Kisin et al. 2009)

Numa perspetiva de ciência química e material, o desenvolvimento de novos produtos usando nanomateriais é emocionante, porque para uma dada partícula-tipo, ao variarmos a escala nanométrica, propriedades físicas e químicas fundamentais parecem mudar, tornando a reação a estes materiais completamente diferente. (Warheit 2007) No entanto, há ainda muitas falhas no conhecimento dos seus riscos ou benefícios. (Shvedova, Kisin et al. 2009)

O atual ritmo a que as nanotecnologias se estão a desenvolver mostra que investigadores e reguladores de saúde ocupacional já se começam a atrasar face ao atual crescimento industrial. Pesquisas iniciais sobre os efeitos na saúde das nanotecnologias indicam que estas têm o potencial de causar inflamação, neoplasias e doenças pulmonares graves. No entanto, a forma precisa como biologicamente interagem com o ser humano é amplamente desconhecida. Neste momento é imperativo pesquisar mais informação para auxiliar os profissionais de saúde e de segurança ocupacional nas implicações destas tecnologias. Contudo, antes de todo este desenvolvimento, primariamente será necessário criarem-se normas, diretrizes e regulamentações para o manuseamento das mesmas. (NSW 2007) O investimento financeiro mundial na pesquisa e desenvolvimento das nanotecnologias tem aumentado drasticamente ao longo dos últimos anos, mas o atual financiamento da promoção industrial supera de longe os gastos com a pesquisa sobre os potenciais riscos para os seres humanos.

Para que se perceba a importância que as nanotecnologias assumem hoje em todo o Mundo, na Europa, mas muito concretamente em Portugal, em novembro de 2005 foi dado o primeiro passo para a criação do Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL). Este abriu as portas em julho de 2009, em Braga, tendo como grande objetivo a investigação de topo de nanotecnologias.

O INL foi concebido para liderar o desenvolvimento de um ecossistema científico e empreendedor inovador, único neste campo de investigação. Trabalha de perto com Universidades, Centros de Pesquisa e Incubadoras de Empresas de todo o mundo para identificar projetos em quatro áreas relacionadas com a nanotecnologia que são muito promissoras para investigação e desenvolvimento: nanomedicina, monitorização ambiental e segurança e controlo de qualidade alimentar, nanoeletrónica e nanomanipulação.

Algumas aplicações das nanotecnologias na medicina já estão em andamento e apresentam-se como grandes promessas, são geralmente apelidadas de “nanomedicina”, ou genericamente, “bionanotecnologia”. A nanomedicina, para além de outras áreas desta ciência humana, tem-se focado em dois aspetos fulcrais da medicina: o diagnóstico e seus exames complementares, mas também a terapêutica que engloba a cirúrgica e a médica/farmacológica.

Na área do diagnóstico e exames complementares, sabe-se hoje que muitas células cancerígenas apresentam uma proteína, o recetor do fator de crescimento da epiderme (EGFR), que se distribui em larga escala na superfície externa das membranas destas, ao invés, aquelas que não contêm a lesão não apresentam quantidades tão elevadas deste mesmo recetor. Associando nanopartículas de ouro a um anticorpo do EGFR, os investigadores são capazes de detetar a ligação deste às células malignas, facilitando e antecipando o seu diagnóstico através da análise anátomo-patológica e imagiológica. Ainda na abordagem a este tema, um novo conceito tem surgido - o “lab-on-a-chip”. Não é mais do que um sistema inserido no organismo que permite a monitorização em tempo real de diversos parâmetros orgânicos e que irá permitir um melhor seguimento dos doentes e respetivas patologias. Estes sistemas estão a ser desenvolvidos com o recurso a nanotecnologias, de forma a tornar os dispositivos inócuos e viáveis para o corpo humano.

No plano do tratamento, também a nanomedicina tem feito alguns avanços. Algumas opções têm surgido na nanocirurgia, com a introdução de novas técnicas que apresentam uma maior precisão e uma menor lesão tecidual em comparação com técnicas tradicionais. São os casos recentes da cirurgia a laser à nanoescala, que permitiu uma menor destruição de órgãos e tecidos celulares, prevenindo a necrose de tecidos adjacentes, ou ainda, como referido anteriormente, através da marcação de células tumorais com ouro à nanoescala. Com este

método é assim possível destruir mais eficazmente as células realmente lesadas e não interferir com aquelas que se encontram sem alterações. (Allhoff, Lin et al. 2010)

Uma outra inovação que a nanomedicina tem feito chegar até nós, encontra-se representada no local de ação específico do medicamento, que é importantíssimo na modulação terapêutica e na efetividade do controlo da dose e da doença. A administração orientada de drogas com o recurso a nanopartículas é mais efetiva para a avaliação da biodisponibilidade, redução de efeitos adversos, diminuição da toxicidade orgânica e ainda de custos. (Gwinn and Vallyathan 2006)

A nanomedicina pode assim ser vista como uma das mais rentáveis aplicações das nanotecnologias, sendo certo que a indústria farmacêutica não a descartará num futuro muito próximo. (Allhoff, Lin et al. 2010)

Outro importante fator que muita curiosidade tem levantado é a forma como as nanopartículas tão facilmente chegam até nós. Estas podem surgir naturalmente (a partir de vírus e incêndios florestais), acidentalmente (escapes de combustão), e ainda através de processos de engenharia (nanotubos de carbono). (NSW 2007)

No caso das NCIs, estas têm tido uma atração especial durante os últimos anos, devido às muitas propriedades tecnológicas interessantes. As propriedades únicas e as suas aplicações têm gerado um largo crescimento económico e tecnológico, mas também expectativas futuras muito elevadas para a indústria envolvida na produção e uso de novos materiais à escala nano. (Savolainen, Alenius et al. 2010)

Assim, os nanomateriais apresentam hoje um novo desafio para os quais serão necessários mais estudos para compreender, prever, e manusear potenciais riscos de saúde para os seus trabalhadores. (NIOSH 2009)

## 5- Desenvolvimento

### 5.1 - Fontes de preocupação / Riscos para a saúde

A nanotecnologia envolve um amplo leque de químicos e estruturas, muitos destes tão novos, que apresentam quer propriedades quer comportamentos imprevisíveis. O lote de elementos usados para produzir NCIs é vasto, como mostra a *tabela 1*. Partindo de uma só nanopartícula há uma variedade muito grande de estruturas possíveis (incontabilizáveis), bastando, por exemplo, alterar a sua forma para que estas possam logo apresentar diferentes comportamentos. Em boa verdade, as estruturas em nanoescala podem ser pensadas como novos químicos no que respeita ao seu potencial tóxico. (Kelly 2009)

Aluminum	Antimony	Barium
Bismuth	Boron	Cadmium
Calcium	Carbon	Cerium
Chromium	Cobalt	Copper
Dysprosium	Erbium	Europium
Gadolinium	Gallium	Germanium
Gold	Hafnium	Holmium
Indium	Iridium	Iron
Lanthanum	Lead	Lithium
Lutetium	Magnesium	Manganese
Molybdenum	Neodymium	Nickel
Niobium	Nitrogen	Osmium
Oxygen	Palladium	Platinum
Potassium	Praseodymium	Promethium
Rhodium	Rhenium	Ruthenium
Samarium	Scandium	Silicon
Silver	Sodium	Strontium
Sulfur	Tantalum	Technetium
Terbium	Thulium	Tin
Titanium	Tungsten	Vanadium
Ytterbium	Yttrium	Zinc
Zirconium		

**Tabela 1-** Lote de elementos utilizados para formar NCIs. Adaptado de (Kelly 2009)

Muito facilmente se percebe que fazer o discernimento da toxicidade das NCI não é, nem será, uma tarefa fácil, uma vez que detalhes químicos das suas estruturas cristalinas, da morfologia, dos contaminantes, do tamanho entre outros fatores têm que ser considerados. (Kagan, Tyurina et al. 2006; Wick, Manser et al. 2007)

Outro ponto que tem surgido como fonte de preocupação é precisamente a “nanotoxicologia”, que tem sofrido “dores de crescimento”, devido a problemas de metodologia. Por exemplo, alguns estudos recentes de toxicidade de nanotubos de carbono (CNTs) foram

conduzidos sem a devida consideração pelos resíduos de catalisadores metálicos remanescentes da sua síntese. Tudo isto resulta em literatura controversa, com a atribuição de propriedades tóxicas aos CNTs que tinham resultado do método de síntese e do seu catalisador residual e não do material em estudo. (Warheit, Laurence et al. 2004)

O próprio modelo de estudo, o tradicional modelo experimental, usado para muitos outros ensaios tem que ser objeto de uma atenção apropriada. (Kelly 2009) Sabe-se que a variabilidade de espécies é suscetível de ser enviesadora, por exemplo, a toxicidade pulmonar de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) (nanoescala) em altas doses difere substancialmente entre ratos e a maioria de outras espécies, incluindo humanos. (Sayes, Reed et al. 2007) Assim, os mais genéricos, simples e amplos estudos *in vitro* poderão não ser preditivos da toxicidade *in vivo* de muitas nanopartículas. (Donaldson and Borm 1998; Sayes, Marchione et al. 2007)

No entanto, é importante ter a noção clara que muitas pessoas estiveram durante muitos anos expostas ocupacionalmente e acidentalmente a nanopartículas, sendo que todo o trabalho que se pretenda desenvolver para o manuseamento correto das NCIs deve ser construído com base na informação já recolhida da toxicidade para esses materiais. (Kelly 2009)

## 5.2- Vias de exposição, translocação no corpo e interação com os sistemas biológicos

Devido à emergência da nanotecnologia, ainda há hoje muitas incertezas quanto às propriedades únicas dos NCIs e dos riscos de saúde ocupacional que estes representam, muito por causa da falta de conhecimentos e fatores que são essenciais para prever esses mesmos riscos. (NIOSH 2009) Destes fatores podemos incluir a *via de exposição*, a *translocação dos materiais* uma vez dentro do corpo e a *interação dos materiais com os sistemas biológicos do organismo*.

### 5.2.1- Via de exposição

O risco e efeitos negativos para a saúde que podem surgir num indivíduo ou numa população como resultado da exposição a um agente químico são geralmente considerados como uma função intrínseca da nocividade desse químico e da dose que se acumula numa área biológica específica. De forma a quantificar e manusear o risco, tendo em conta que a dose é difícil de medir, usa-se a exposição como sendo um “procurador” desta. Num sentido lato, a International Society of Exposure Analysis, define que exposição é “o contacto entre um agente e um alvo”, sendo o Homem o alvo e o contacto com uma superfície de exposição durante um certo período. (Zartarian, Bahadori et al. 2005) O risco potencial de saúde após a exposição a uma substância está geralmente associada à magnitude e duração dessa exposição, à permanência do material no corpo, à toxicidade inerente ao material e à suscetibilidade individual de cada pessoa para ser afetada pelo produto. (NIOSH 2009)

As principais vias de exposição a partículas por parte dos trabalhadores são a **inalatória**, a **digestiva** e a **dérmica**.

### **5.2.1.1- Via inalatória**

A via de exposição mais comum para nanopartículas no ar, nos locais de trabalho, é a inalatória, onde estas podem evitar a normal defesa fagocitária do sistema respiratório e difundir-se por todos os alvéolos pulmonares. (Song, Li et al. 2009) Uma vez inaladas, as partículas irão depositar-se em todas as regiões do trato respiratório. (Stone 2009) A deposição discreta de partículas no trato respiratório é determinada pelo seu diâmetro aerodinâmico e termodinâmico (dependente do tamanho da partícula). Os aglomerados de nanopartículas ir-se-ão depositar de acordo com o diâmetro e não com o constituinte do nanomaterial. Estão em curso alguns estudos de forma a perceber qual o fator físico que faz aglomerar ou desaglomerar nanopartículas, e qual o papel desse estado físico na toxicidade relativa à inalação destas. (NIOSH 2009)

Sabe-se ainda que nanopartículas pequenas são depositadas nos pulmões em maior escala do que partículas maiores respiráveis (ICRP 1994); a deposição aumenta com o exercício físico devido ao aumento da frequência respiratória, mudando quando a via é a nasal ou a bucal (Jaques and Kim 2000; Daigle et al. 2003) e/ou em pessoas com doenças pulmonares prévias (Brown et al. 2002).

### **5.2.1.2- Via digestiva**

A ingestão é outra forma pela que qual as nanopartículas podem entrar no organismo. Pode ocorrer de forma não intencional, com o contacto das mãos com a boca que fazem a transferência dos materiais, sendo este um achado frequente nos materiais tradicionais e, por isso mesmo, assume-se que ocorra da mesma forma nas nanopartículas. A ingestão pode também acompanhar a inalação, uma vez que as partículas são removidas do trato respiratório pelos movimentos mucociliares, podendo ser assim engolidos (ICRP 1994). Contudo, ainda muito pouco é sabido sobre os efeitos adversos da ingestão de nanopartículas. (NIOSH 2009) No futuro, devido ao

aumento do uso da nanotecnologia em materiais/alimentos ingeridos (por exemplo na conservação de alimentos), talvez esta via seja melhor estudada e considerada. (Savolainen, Alenius et al. 2010)

### 5.2.1.3- Via dérmica

A pele humana é o maior órgão do corpo, protegendo-o contra agressões externas, apresentando uma área de superfície próxima dos 18,000 cm<sup>3</sup>. Materiais com ou sem polaridade podem penetrar pelo *stratum corneum* através de uma rota paracelular. (Menon and Elias 1997) Ondas fotomecânicas têm revelado um aumento da permeabilidade do *stratum corneum in vivo*, uma vez que induzem a expansão dos espaços lacunares, o que permite a formação de canais transitórios para facilitar o transporte de macromoléculas em epiderme viável. (Menon, Kollias et al. 2003; Gwinn and Vallyathan 2006) Um estudo revelou que nanopartículas com propriedades físico-químicas variadas são capazes de penetrar a pele de porco intacta. (Ryman-Rasmussen, Riviere et al. 2006) Estas nanopartículas apresentavam diferentes tamanhos, formas e revestimento. Verificou-se que estes materiais eram capazes de penetrar o *stratum corneum* por difusão passiva e conseguiu-se localizá-los dentro da epiderme e das camadas da derme, num período de 8 a 24 horas. Este estudo sugere que a pele é umas das vias de exposição para as nanopartículas, no entanto, os resultados são ainda inconclusivos. (NIOSH 2009)

Neste momento não é sabido se a penetração pela pele vai causar efeitos adversos, pois esses estudos não fizeram referência a modelos animais. Contudo, estudos *in vitro* que usaram células de pele humana e de síntese mostraram que nanotubos de carbono de multicamada (MWCNTs) são capazes de entrar nas células e causar libertação de citocinas pró-inflamatórias, stresse oxidativo e diminuir a viabilidade destas. (Shvedova, Castranova et al. 2003; Monteiro-Riviere, Nemanich et al. 2005) Apesar de tudo, não é muito claro como é que estes achados podem ser extrapolados para a saúde ocupacional, mas de certo que esta via de exposição terá

muita importância na exposição a nanopartículas em pele lesionada ou concomitantemente exposta. (NIOSH 2009)

Num estudo recente em trabalhadores expostos a nanopartículas de TiO<sub>2</sub> mostrou-se que estes têm um elevado risco de resposta citotóxica para uma alta concentração relativa no ar e para uma faixa de tamanho dos 10-30 nm. (Liao, Chiang et al. 2009)

Ainda assim não é dada grande relevância a esta via, uma vez que a penetração na pele não é a mais relevante no contexto ocupacional e até mesmo no contexto de consumo, sendo apenas encontrados alguns tipos de nanomateriais, como por exemplo nos constituintes de alguns cosméticos.

### **5.2.2- Translocação no corpo e interação com os sistemas biológicos**

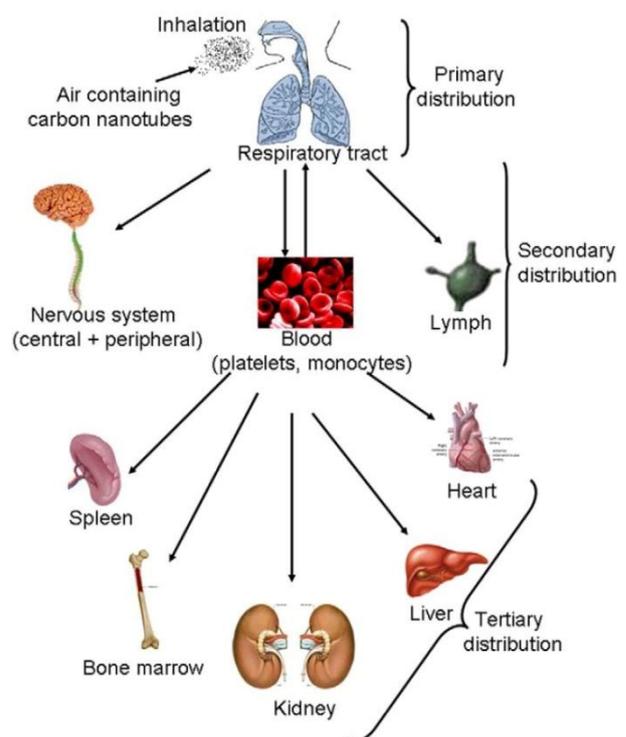
É conhecido há muitos anos que algumas nanopartículas intactas atravessam o trato digestivo e respiratório, registando-se o seu aparecimento noutros locais do organismo. (Nemmar, Hoet et al. 2002) “Ao contrário de outras partículas maiores, uma vez instaladas, as nanopartículas conseguem rapidamente deslocar-se para outros locais extrapulmonares”. (Kayat, Gajbhiye et al. 2011) Embora sujeita a alguma controvérsia devido às limitações metodológicas (Takenaka, Karg et al. 2001; Nemmar, Hoet et al. 2002), as nanopartículas inaladas têm capacidade de contornar as células do pulmão, entrar no espaço intersticial e distribuírem-se sistemicamente. (Nemmar, Hoet et al. 2002) Isto de facto acontece, mas a dimensão e significância do processo mantêm-se em questão. Alguns estudos que sugeriam uma muito rápida translocação de partículas para fora do pulmão mostravam falhas (Kreyling, Semmler et al. 2002; Chen, Tan et al. 2006; Semmler-Behnke, Takenaka et al. 2007; Mercer, Scabilloni et al. 2008), mas um trabalho recente apresentou uma lenta migração de uma pequena percentagem de

partículas para fora do pulmão, que era exacerbada pela inflamação pulmonar. (Lademann, Weigmann et al. 1999)

No passado, os sistemas cardiovascular, neurológico e excretor não eram considerados como alvos patológicos das partículas toxicológicas inaladas. Contudo, nos últimos anos muitos estudos têm mostrado translocações de químicos para a circulação sistêmica, fígado, coração, rim, sistema imunológico e cérebro. (Kreyling, Semmler et al. 2002; Nemmar, Hoylaerts et al. 2002; Oberdorster, Sharp et al. 2002) Alguns autores mostraram que nanopartículas de irídio radioativo<sup>191</sup> injetadas pela via intravenosa são rapidamente excretadas na urina, mas parte da dose é amplamente distribuída por um número vasto de órgãos do corpo. (Kreyling, Semmler et al. 2002; Savolainen, Alenius et al. 2010) Também outros estudos mostraram que nanopartículas de óxido de manganésio inalado podiam entrar no bulbo olfativo, por baixo do prosencéfalo por via dos axônios do nervo olfativo no nariz, ou seja, eram encontrados no epitélio olfativo e podiam ainda alcançar outras partes do cérebro quer por esta via, quer pela componente sistêmica. (Oberdorster, Sharp et al. 2004;

Elder, Gelein et al. 2006) Sabe-se que estes produtos alcançam o cérebro e suas diferentes estruturas, desconhece-se no entanto que lesões *major* são causadas e a sua toxicidade. Sabe-se apenas, segundo algumas publicações, que pode ocorrer uma inflamação do tecido neuronal. (Kelly 2009) Este aspeto intrigou mesmo o *International Council on Radiation Protection* à luz do modelo de deposição pulmonar. O novo estudo mostrava que

nanopartículas menores que 10 nm de diâmetro aerodinâmico depositavam-se preferencialmente



**Figura 2-** Modelo de distribuição de CNTs no organismo. Retirado de (Kayat, Gajbhiye et al. 2011)

nas vias respiratórias na região da cabeça em detrimento do espaço alveolar. (Lockman, Mumper et al. 2002; Jain 2007; Sadauskas, Wallin et al. 2007) Em 2008, há registros de que a inalação de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> em ratos também alcançava a circulação sistêmica. (Nurkiewicz, Porter et al. 2008) Estas descobertas permitiram demonstrar que diferentes tipos de nanomateriais inalados podem alcançar a circulação sistêmica e por esta via distribuírem-se por um conjunto diferente de órgãos. (Savolainen, Alenius et al. 2010) Contudo, há uma crítica muito valorizada que retira alguma relevância ao estudo. Foi referido que estes trabalhos foram realizados com ratos, que são mamíferos que apresentam uma abundante mucosa olfativa comparativamente com os humanos, o que permitiria mais facilmente que estas partículas atingissem o cérebro pela via nervosa. (Zartarian, Bahadori et al. 2005) Apesar disso, estas descobertas abriram caminho a uma importância na pesquisa mais detalhada da capacidade das diferentes nanopartículas para entrarem no organismo, pelas diferentes vias de distribuição, cuja inalação é a mais frequente. Acontece que, genericamente, as consequências das nanopartículas que translocam no organismo ainda não foram devidamente comprovadas.

Há estudos relatados da toxicidade cardiovascular dos CNTs aspirados pelos pulmões em ratos geneticamente modificados, para desenvolver aterosclerose. (Nemmar, Hoylaerts et al. 2004) (NIOSH 2009) Esta exposição pulmonar resulta em toxicidade cardiovascular, incluindo uma aterosclerose acelerada, lesão do tecido cardíaco, stresse oxidativo e lesões do DNA mitocondrial da aorta. O nível usado no estudo foi o planejado de forma a ser equivalente ao potencial de exposição referente ao Permissible Exposure Limits (PEL) para a grafite respirável. (NIOSH 2009)

Não se sabe se esta toxicidade cardiovascular é totalmente devida às nanopartículas translocadas que atuam diretamente na aorta e tecido cardíaco, ou se é resultado de alguma resposta secundária à inflamação observada no tecido pulmonar. Convém salientar que a

inalação de partículas ultrafinas de combustão ambiental também é uma causa dessa mesma toxicidade cardiovascular. (Kelly 2009)

Num trabalho já publicado por Castranova descobriu-se que partículas de TiO<sub>2</sub> instiladas no pulmão de ratos são a causa da disfunção do sistema microvascular. Animais tratados mostraram reversão e até mesmo uma perda de energia dose-dependente na resposta a vasodilatadores e esta foi mais grave para as nanopartículas do que para as micro, tudo isto num só registado diário de administração. A microscopia confocal mostrou ainda leucócitos polimorfonucleares que se acumularam rapidamente ao longo das paredes microvasculares, o que, devido à rapidez da resposta, se acredita que seja um efeito mais sistémico do que propriamente resultado das partículas translocadas. Um outro estudo também apresentou registos preliminares que sugerem que a exposição pulmonar a MWCNTs e a nanofios de TiO<sub>2</sub> podem degradar a integridade da barreira hemato-encefálica e causar lesões cerebrais, primariamente no bulbo olfativo, no hipocampo e no córtex frontal. (NIOSH 2009) Nestes estudos, estes acontecimentos não se verificaram devido à translocação pelo nervo olfativo, uma vez que os efeitos dos MWCNTs foram verificados para doses no espectro de pessoas expostas a PEL por grafite. (Kelly 2009)

Ainda sobre uma das possíveis interações com outros sistemas biológicos temos a potencial toxicidade reprodutiva dos NCIs. Um pequeno relatório indicou que nanopartículas de ouro poderão ter um impacto negativo na função espermática *in vitro*, (Yoshida, Hiyoshi et al. 2009) e adicionalmente outro estudo revelou ainda que a deposição de “negro de carvão” (*carbon black*) no pulmão tem um impacto negativo no sistema reprodutivo dos roedores. (Tsuchiya, Yamakoshi et al. 1995; Tsuchiya, Oguri et al. 1996)

Contudo, crê-se pela literatura revista que estes estudos ainda são poucos para efetivamente se inferir da relação causa-efeito da toxicidade das nanopartículas no sistema reprodutor. (Kelly 2009)

### 5.3- Estudos de toxicologia com nanopartículas

Alguns estudos foram realizados para avaliar o potencial de toxicidade humana de uma ampla variedade de nanomateriais usando os seguintes modelos: *in vivo* (com roedores) ou *in vitro* (com linhas celulares).

Os modelos com animais têm sido utilizados para estudar um infindável número de doenças, incluindo partículas que induzem as lesões do pulmão (onde podemos encontrar o quartzo e asbestos que conduzem a esta patologia); contudo, há também uma noção clara das limitações destes modelos na forma como se pode extrapolar a avaliação de perigo para o ser humano.

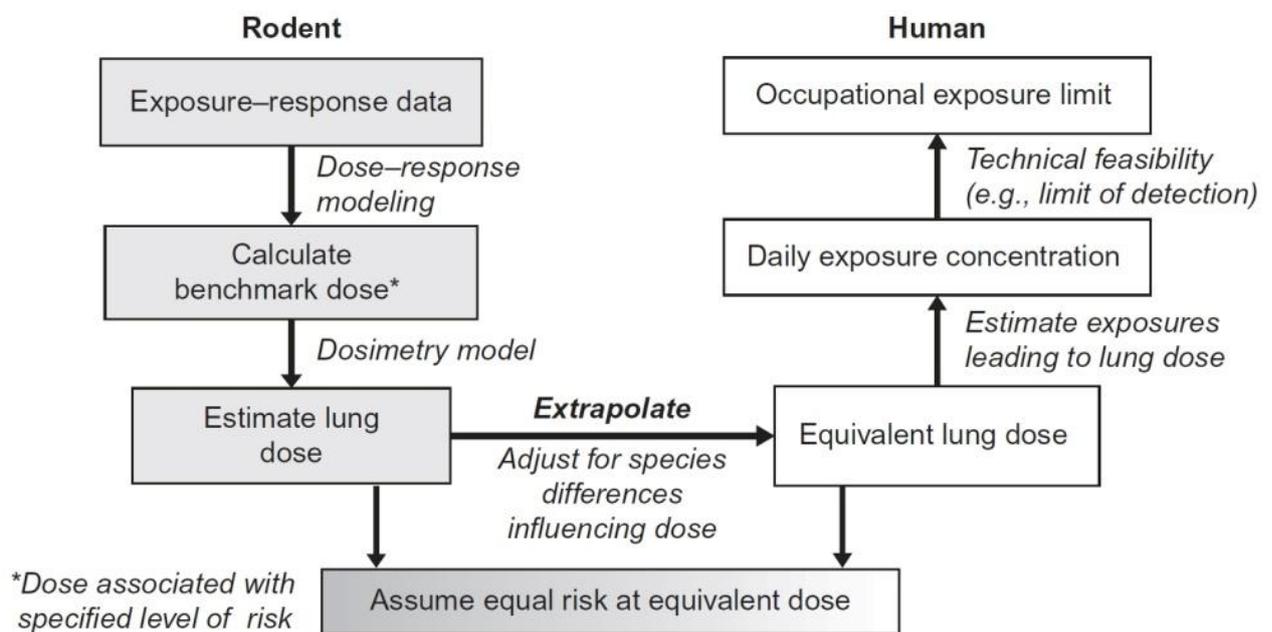
O conhecimento atual não é muito objetivo na inclusão das diferentes espécies nos modelos experimentais, mas os bancos de dados existentes, que contêm a combinação da toxicidade das partículas com esses mesmos modelos, fornecem uma série útil de protocolos que permitem uma comparação de novos materiais com o potencial de risco relativo dessas substâncias já estudadas.

As linhas celulares são frequentemente utilizadas para investigar os efeitos das substâncias potencialmente tóxicas. Os tipos de células disponíveis são muitas e representam uma ampla faixa de linhas celulares e de órgãos, incluindo células transformadas e derivadas de tumores. A sua resposta geralmente é representativa daquilo que acontece *in vivo*, mas comparações e controlos cuidadosos são requisitos mínimos para que tenhamos um estudo com relevância elevada. Um dos grandes problemas dos modelos *in vitro* é o uso de concentrações excessivas para conhecer a toxicidade e a avaliação dos seus mecanismos.

Apesar de uma ampla gama de concentrações serem úteis para gerar valores comparativos (como o caso do LD50, NOEL, etc.), a observação de um efeito *in vitro* não deve ser tomada

como um indicativo de um efeito *in vivo*, sem se considerar a relevância das doses e os *endpoints* medidos. Mesmo as medições citotóxicas são hoje registradas como doseadores dos efeitos subletais *in vitro* e não tanto como fatores de risco de exposição.

Estas conclusões que vêm sendo conhecidas permitiram perceber as prioridades quando se está a estudar a toxicidade de nanomateriais em seres humanos e o rigor que deve existir para que se possa tirar conclusões efetivas, partindo de um determinado estudo. (Stone 2009)



**Figura 3-** Sequência de avaliação de riscos para exposição a partículas inaladas, usando um modelo animal, para desenvolver limites de exposição ocupacional. Retirado de (Ramachandran and Schaub 2011)

#### 5.4- Classes de nanomateriais

Hoje em dia, devido à emergência do conhecimento nesta área, foi necessário dividir-se os nanomateriais em quatro grandes classes, que têm sido alvo de muitas considerações bibliográficas. Destacam-se os *fulerenos de carbono*, os *nanotubos de carbono*, os *metais* e os *óxidos metálicos*. Nesta dissertação abordaram-se apenas os dois primeiros grupos, devido ao seu maior uso relativamente aos restantes.

##### 5.4.1- Fulerenos de carbono

Os fulerenos foram inicialmente descobertos por Kroto et al. (1985). São um alotropo do carbono com estrutura similar à grafite, mas enrolados em forma de gaiola ou esfera oca. (Aschberger, Johnston et al. 2010) Apesar de frequentemente se descrever os fulerenos como compostos com 60 ou mais átomos de carbono, a verdade é que estes geralmente são estruturas que se cristalizam em partículas maiores. O fulereno Buckminster ( $C_{60}$ ), que consiste em 60 átomos de carbono estruturados em forma de esfera por ligações de Van der Waals e que apresenta um diâmetro de aproximadamente 1nm, é o tipo de fulereno mais comum com propriedades específicas que serão exploradas neste trabalho. (Stone 2009)

Os fulerenos, como outras nanopartículas, têm propriedades que tornam a sua exploração interessante com aplicações na medicina e na tecnologia, onde se inclui o seu pequeno tamanho, a grande área de superfície e a elevada reatividade. (Aschberger, Johnston et al. 2010) Identificar os perigos relacionados com a exposição a fulerenos é uma tarefa árdua, uma vez que há um enorme número de derivados conhecidos, fator que decorre do diferente número de átomos que é usado para gerá-los, do conjunto de moléculas que pode ser associado à estrutura e ainda dos processos físicos a que este é sujeito para torná-lo solúvel, como por exemplo, no uso de aplicações farmacêuticas (cosméticos). (Stone 2009) Esta sua facilidade de deixar ligar à sua

superfície algumas moléculas ativas, tornou-a também uma substância com uma atividade biológica muito elevada, chegando mesmo a ser denominada por “esponja de radicais”. (Nielsen, Roursgaard et al. 2008; Johnston, Hutchison et al. 2010)

As diferentes características físico-químicas dos vários tipos de fulerenos influenciam a sua atividade biológica e conseqüentemente o seu potencial de toxicidade. Os fulerenos geralmente são produzidos como formas funcionantes e esses grupos funcionais são chaves determinantes das suas propriedades.

O crescimento antecipado do mercado, em combinação com a exposição humana direta através de aplicações, como os cremes usados na pele ou os medicamentos, conduziu a uma importância generalizada do seu potencial de causar efeitos adversos na saúde humana. (Aschberger, Johnston et al. 2010)

#### **5.4.1.1- Estudos *in vivo* da toxicidade dos fulerenos**

Devido à enorme quantidade de produtos que contém fulerenos é normal que a exposição a estes ocorra pelas vias oral, pulmonar, dérmica e injetável. Por isso, a toxicidade no local de exposição é particularmente interessante, apesar de se saber que estes se irão distribuir e acumular noutros órgãos distantes da porta de entrada, como é o caso do fígado e do rim. Apesar de tudo, os estudos com fulerenos relatados *in vivo* são poucos, o que leva a um registo limitado da sua toxicidade. (Stone 2009)

#### Exposição Pulmonar aos Fulerenos

Artigos anteriores deram destaque ao tamanho da partícula como determinante da sua toxicidade particularmente nas nano-dimensões, uma vez que estas são mais tóxicas do que as equivalentes de tamanhos maiores. (Ferin, Oberdorster et al. 1992) Essa relevância para os

fulerenos é digna de se considerar, devido às suas definições como nanopartícula. Num estudo, um grupo de ratos foi exposto a nanopartículas de  $C_{60}$  (55nm de diâmetro;  $2,22 \text{ mg m}^{-3}$ ) e outro a micropartículas de  $C_{60}$  ( $0,93 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro;  $2,35 \text{ mg m}^{-3}$ ) por via nasal. Apurou-se que o primeiro grupo apresentava uma carga acumulada de  $C_{60}$  no pulmão 50% maior do que o segundo. Apesar de tudo, o tempo de semi-vida e de eliminação foi similar em ambos os grupos e não foram detetadas quaisquer lesões ou inflamações do tecido pulmonar. (Baker, Gupta et al. 2008)

Muitos outros estudos demonstraram ainda que uma grande quantidade de nanopartículas era capaz de induzir efeitos pró-inflamatórios no pulmão (Donaldson and Stone 2003), mas há uma outra investigação que se limitou a avaliar o potencial efeito anti-inflamatório dos fulerenos em doses de 0,02 a  $200\mu\text{g}$  por rato. (Roursgaard, Poulsen et al. 2008) O interesse era tentar perceber se estas substâncias tinham capacidade de atenuar o efeito inflamatório pulmonar provocado pelo  $\alpha$ -quartzo nos ratos. De facto, verificou-se que nos ratos sensibilizados com baixas doses de fulereno a resposta inflamatória ao  $\alpha$ -quartzo era menor, o que foi justificado pela capacidade do fulereno em reduzir as espécies reativas de oxigénio (ERO) quando usadas em subdosagem. Assim, conclui-se que quando usado em baixas dosagens, os fulerenos têm propriedades anti-inflamatórias, ao invés da sua capacidade pró-inflamatória em altas concentrações, que foi verificada quando se expôs a uma amostra intratraqueal. (Stone 2009)

No entanto, este efeito pró-inflamatório é contradito com o estudo em que se colocou toda a superfície de corpo de ratos em contacto com  $C_{60}$ , ao longo de um período de tempo. Verificou-se que apesar de ocorrer estimulação de um pequeno número de genes envolvidos na inflamação, stresse oxidativo, apoptose e atividade da endopeptídase metálica, a resposta e lesão do tecido não era tão severa em magnitude como o expectável pela exposição. (Fujita, Morimoto et al. 2009) Anos antes, uma outra investigação revelou também que não havia registo de

toxicidade pulmonar associada a exposição intratraqueal de C<sub>60</sub> de ratos, ao contrário do que já se havia verificado para a reação ao  $\alpha$ -quartzo, que é pró-inflamatório e pró-fibrótico naturalmente. (Sayes et al. 2007)

#### Exposição Intraperitoneal, Dérmica e Administração Oral

Num limitado número de estudos elaborados, a injeção intraperitoneal de fulerenos foi usada para estudar a biocompatibilidade destes e a sua distribuição tecidual. (Chen, Wilson et al. 1998) Verificou-se que os fulerenos são capazes de desencadear uma resposta antigénica, devido à sua capacidade de modular a resposta inflamatória. Adicionalmente, o rim, o fígado e o baço demonstraram ser um alvo da toxicidade dos fulerenos. No entanto, a aplicabilidade deste estudo para derivados dos fulerenos requer mais investigação. (Chen, Yu et al. 1998)

Há um vazio de estudos sobre as consequências da exposição dérmica aos fulerenos, sendo que existe hoje a percepção de que não ocorrem irritações da pele com o contacto do mesmo. No entanto, é necessária uma maior investigação sobre este tema.

Também a administração oral tem um limitado número de estudos realizados. Pensa-se que os fulerenos são essencialmente eliminados nas fezes, quando administrados por via oral, no entanto, há uma parte destes que é absorvida pela parede intestinal e entra na circulação, acabando nomeadamente por ser excretada pela urina. (Yamago, Tokuyama et al. 1995; Mori, Takada et al. 2006) Contudo, estes estudos consideram-se ainda inconclusivos quanto à transferência de fulerenos para a circulação e assim de todo o circuito percorrido aquando da ingestão oral. (Stone 2009)

Toxicocinética - Absorção, Metabolismo, Distribuição e Eliminação

Investigações toxicocinéticas são importantes de forma a identificar possíveis órgãos de destino dos tóxicos de fulerenos seguindo a via inalatória, oral ou de exposição dérmica. Há barreiras que previnem a absorção no local de exposição e a distribuição para os locais alvo. Contudo, em tecidos saturados de fulerenos, estas barreiras podem tornar-se permissivas e deixar dispersar o efeito tóxico da substância pelo corpo. (Aschberger, Johnston et al. 2010)

*Absorção**-Oral*

Derivados dos fulerenos ( $^{14}\text{C}$ ) não foram absorvidos com eficácia pela via oral em ratos, e 97% desse produto foi diretamente excretado pelas fezes. (Yamago, Tokuyama et al. 1995) A absorção de fulerenos foi também sugerida como um dano oxidativo observado de forma dose-dependente no fígado e pulmão por via da exposição oral em gorduras. (Folkmann, Risom et al. 2009)

*-Inalação*

Ao contrário de estudos existentes para outros nanomateriais, segundo a revisão bibliográfica atual, não há achados que permitam concluir que os fulerenos sejam capazes de entrar significativamente em circulação e demonstrar o seu potencial tóxico pela via inalatória. (Aschberger, Johnston et al. 2010)

*-Exposição Dérmica*

Estudos em pele de porco *in vivo* e em culturas celulares *in vitro* mostraram que nanopartículas de fulereno primitivo podem penetrar profundamente a pele, através do *stratum*

*corneum* e serem moduladas por um solvente, uma vez que nesse caso o fulereno se encontra disperso. Nesta observação, os autores concluíram que a penetração na pele pelos fulerenos está muito dependente do solvente e o mesmo deve ser considerado na sua avaliação do risco associada à produção industrial. (Xia, Monteiro-Riviere et al. 2010) É dada assim uma importância muito relevante ao meio em que se “desloca” o nanomaterial.

#### *Distribuição, metabolismo e eliminação*

Há pouca informação relatada sobre a distribuição de fulerenos, provavelmente devido à limitada absorção pelas vias acima enumeradas.

Um estudo recente revelou que existe uma translocação de fulerenos insignificante para o cérebro e outros órgãos do rato, por via da instilação intratraqueal e exposição inalatória. As experiências desenvolvidas revelaram que não existe distribuição da substância partindo do pulmão através da instilação intratraqueal, no entanto, quando essa exposição foi realizada pela via inalatória pequenos vestígios de fulerenos foram encontrados nos rins desses animais, sem que ocorressem alterações no baço ou fígado. (Aschberger, Johnston et al. 2010)

Já no caso da via injectável (intraperitoneal), foi possível registar que o transporte pelo sangue ia conduzir a uma acumulação de substâncias no fígado (órgão preferencial), rins e baço, com evidências de manifestação de toxicidade nesses locais. (Chen, Yu et al. 1998)

Esta acumulação no fígado sugere que este seja o local onde ocorre o metabolismo dos fulerenos, no entanto, mais informações serão necessárias para uma mais correta avaliação. (Gharbi, Pressac et al. 2005)

A eliminação de fulerenos no corpo ocorre através das fezes como foi demonstrado pelos autores anteriormente citados. (Yamago, Tokuyama et al. 1995; Mori, Takada et al. 2006)

Verifica-se uma excreção mais demorada quando a via de administração é a injetável em comparação com a oral, uma vez que nesta última a absorção é muito limitada ao nível intestinal.

Mais informações são necessárias para clarificar e confirmar quais as vias metabólicas seguidas pelos no organismo, permitindo desta forma perceber em que órgãos se depositam preferencialmente. (Aschberger, Johnston et al. 2010)

#### **5.4.1.2- Estudos *in vitro* da toxicidade dos fulerenos**

Tal como nas avaliações *in vivo*, também os estudos *in vitro* carecem de alguma falta de investigação de forma a poderem descrever adequadamente o potencial tóxico dos fulerenos. A pouca bibliografia existente foca-se sobretudo na toxicidade dérmica e cardiovascular destas substâncias. (Stone 2009)

##### Modelos dérmicos e efeitos cardiovasculares

Colocaram-se queratinócitos humanos expostos a um tipo de fulerenos ( $^{14}\text{C}$ -  $\text{C}_{60}$ ) e, 6 horas após o contacto, verificou-se que estes tinham uma concentração intracelular de 50% da amostra inicial. Apesar de tudo, não tinha ocorrido qualquer impacto na proliferação celular. (Stone 2009) Ainda assim, verificou-se uma baixa de proliferação celular quando a exposição foi feita durante um longo período de tempo e com uma alta concentração do produto em estudo. (Rouse, Yang et al. 2006) De igual forma conseguiu registar-se um aumento da resposta inflamatória, mediada pelas interleucinas (IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ ). Esta experiência permitiu ainda perceber que a entrada, e por consequência os efeitos desta substância, estão dependentes das condições da pele. Conseguiu-se assim mostrar que a entrada do fulereno é feita pelos espaços lacunares existentes e não diretamente pelas células.

Quanto aos efeitos cardiovasculares em modelos, também estes não têm grandes registros na literatura. Existe uma observação de que um potencial efeito trombogénico estará associado aos fulerenos, contudo, esta não obteve grande comprovação prática. (Radomski, Jurasz et al. 2005) Também durante a injeção de fullerol ( $C_{60}(OH)_{24}$ ), percebeu-se que ocorre uma deposição endotelial nos vasos sanguíneos que pode eventualmente resultar em lesões vasculares. (Yamawaki and Iwai 2006)

#### **5.4.1.3- Mecanismos biológicos da toxicidade dos fulerenos**

Alguns investigadores demonstraram que os fulerenos são capazes de provocar uma toxicidade mediada e estimulada por uma resposta inflamatória e por um stress oxidativo.

##### Resposta inflamatória, propriedade pró e antioxidantes, e citotoxicidade

Após a inalação de nanopartículas, estas podem ser translocadas e alcançar o alvéolo pulmonar, permanecendo aí por um longo período de tempo. Nesse local, estas podem induzir stress oxidativo, devido à produção de EROs, inflamação progressiva e persistente e causar lesões crónicas irreversíveis, como é o caso da fibrose ou até mesmo de tumores. Alguns destes efeitos podem também ser relevantes para os fulerenos, contudo, muitos estudos revelam resultados contraditórios. (Johnston, Hutchison et al. 2010)

Investigações *in vitro* mostraram ainda que a resposta inflamatória pode resultar de uma exposição a fulerenos com produção de mediadores pró-inflamatórios, como é o caso da IL-8 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). (Aschberger, Johnston et al. 2010; Park, Kim et al. 2010) A concentração-dependente foi a forma como alguns autores demonstraram que os fulleróis apresentam um efeito quer anti-inflamatório, quando em baixas doses, quer pro-inflamatório, se estão em alta concentração. (Roursgaard, Poulsen et al. 2008)

Ainda nesta área, outros estudos demonstraram haver numa variedade de linhas celulares (fibroblastos da derme, hepatócitos e astrócitos) citotoxicidade mediada através de EROs aumentados, peroxidação de lípidos e lesões da membrana por nano-C<sub>60</sub>. (Sayes, Gobin et al. 2005) Observações idênticas foram feitas em C<sub>60</sub> e C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> provocando lesão da membrana em condições fotossensíveis, que foi responsável pelo aparecimento de peroxidação lipídica de lisossomas de fígado isolado de rato. (Kamat, Devasagayam et al. 2000)

Relativamente à capacidade antioxidante dos fulerenos existe um número considerável de estudos que relatam esta sua propriedade, o que contraria em parte a ideia que existia do seu efeito tóxico. O C<sub>60</sub> e os seus derivados podem hoje ser responsáveis por efeitos benéficos para a saúde, devido ao seu potencial de eliminação de radicais livres. (Wang, Tai et al. 1999; Gharbi, Pressac et al. 2005; Xiao, Takada et al. 2006; Yin, Lao et al. 2009)

Contudo, estas propriedades antioxidantes demonstradas por fulerenos são restritas a certas formas e dependem de outros parâmetros como a solubilidade em água e a concentração administrada. (Aschberger, Johnston et al. 2010)

#### 5.4.2- Nanotubos de carbono

Os CNTs são de entre os NCIs aqueles que apresentam uma maior número de características únicas e promissoras. A produção global de CNTs já alcançou mesmo centenas de toneladas por ano e expande-se rapidamente a novas aplicações e materiais da indústria. (Mitchell, Gao et al. 2007)

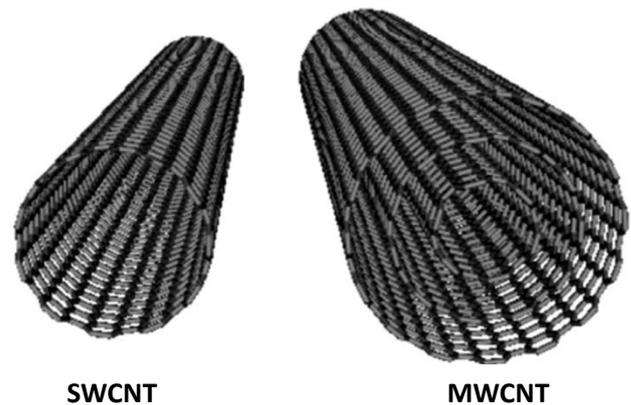
O potencial de uso e aplicação de CNTs são muito amplos e variados, incluindo:

- Plásticos reforçados de nanotubos de carbono;
- Blindagens de transmissões eletromagnéticas ou radiofrequência;
- Materiais anti-estáticos;
- Polímeros de fibras flexíveis e reforçados, devido às suas propriedades mecânicas;
- Armazenamento de energia elétrica e de hidrogénio;
- Microscopia eletrónica de varrimento. (Stone 2009)

Nenhum outro material foi desenvolvido que possuísse o tamanho (1-20nm em largura e muitos micrómetros em comprimento), força e propriedades químicas de superfície dos CNTs. Algumas dessas propriedades que tornam os CNTs exclusivos são, no entanto, fonte de alguma preocupação no seu manuseamento devido à sua biocompatibilidade, especialmente no pulmão. A sua relação comprimento/largura ( $> 1000$ ), a superfície química reativa, e as precauções levantadas com a pouca solubilidade tem estado associada a experiências passadas com fibras perigosas para a saúde (ex. asbestos). (Mitchell, Gao et al. 2007) Fibras reativas persistentes levam a reações oxidativas que resultam na lesão do pulmão. (McClellan 1994) A importância do estudo de toxicidade de fibras para a biocompatibilidade dos CNTs tem sido sugerida, mas ainda não se encontra bem estabelecida a sua associação. (Magrez, Kasas et al. 2006; Mitchell, Gao et al. 2007)

Estudos recentes demonstram que os CNTs induzem lesões pulmonares, incluindo fibrose, quando instilados no pulmão de ratos. Em 2006, publicou-se uma revisão sobre as fontes, características e a toxicologia dos CNTs. (Lam, James et al. 2006) A nota particular e importante que resultou foi esclarecedora que os CNTs existem em diferentes formas, que inclui os nanotubos de carbono em camada simples (SWCNTs), os CNTs de dupla camada, e os nanotubos multicamada (MWCNTs). Além do potencial de exposição ocupacional, verificou-se também existirem registros de exposições ambientais de baixa concentração para MWCNTs, mas não para os SWCNTs. Concluiu-se que a presença de MWCNTs no ambiente foi registrada devido à emissão de combustões encontradas em gasodutos. (Murr, Garza et al.

2005)



**Figura 4-** Single and Multi-Walled Carbon Nanotubes. Retirado de (Kelly 2009)

Importante será mesmo reter que as respostas toxicológicas e biológicas ao CNTs variam em dependência da dose, da via de distribuição e do tipo de composto. (Mitchell, Gao et al. 2007)

#### **5.4.2.1- Estudos *in vivo* da toxicidade dos CNTs**

Em relação aos perigos dos CNTs, as pesquisas têm sido dirigidas no sentido de verificar a potencialidade de exposição através da via respiratória e penetração dérmica durante a produção e utilização destes. Além disso, a longevidade no sítio de exposição e o potencial de distribuição dentro do corpo com a consequente exposição têm sido alvo de um limitado número de estudos. Alguns destes têm como objetivo o conhecimento da biocompatibilidade dos CNTs usados em aplicações biomédicas como é o caso dos medicamentos. (Stone 2009)

### Exposição Pulmonar aos CNTs

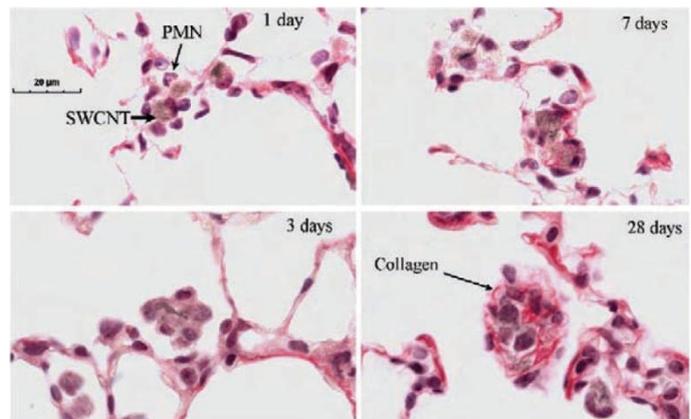
Alguns estudos de toxicidade pulmonar *in vivo* dos CNTs foram realizados através da instilação intratraqueal (Lam, James et al. 2004; Warheit, Laurence et al. 2004; Muller, Huaux et al. 2005) ou em aspirações faríngeas (Shvedova, Kisin et al. 2005). Cada uma destas publicações registou efeitos pulmonares significativos, que incluíam inflamação, evidências de stresse oxidativo, fibrose (Shvedova, Kisin et al. 2005) e formação de granulomas. (Lam, James et al. 2004; Warheit, Laurence et al. 2004; Muller, Huaux et al. 2005; Shvedova, Kisin et al. 2005) Registaram-se ainda granulomas multifocais mesmo na ausência de mudanças da dose, não sendo assim relacionados com alterações da dose-resposta, bem como falta de correspondência com parâmetros de avaliação da lavagem pulmonar e proliferação de lesões celulares. (Warheit et al. 2004)

Estas respostas transitórias e não monotónicas foram potencialmente atribuídas à via de administração artificial do material para o pulmão (bólus), a instilação. (Warheit et al. 2004) Quando utilizada outra via (aspiração faríngea), estudos relataram melhorias na relação linear dose-resposta e nas observações adicionais da lesão fibrótica, chegando-se à conclusão que esta via permitiria uma melhor distribuição pulmonar. (Shvedova, Kisin et al. 2005)

Os estudos de biocompatibilidade dos CNTs formam uma base inicial para avaliar os seus riscos. Contudo, tem sido afirmado por vários pesquisadores a necessidade de se realizarem estas experiências por inalação dos CNTs (em contraste com a instilação e a aspiração), de forma a contextualizar os resultados anteriores. (Warheit, Laurence et al. 2004; Lam, James et al. 2006; Mitchell, Gao et al. 2007) Para colmatar este fim, desenvolveu-se um sistema de exposição por inalação que atinge todo o corpo dos ratos permitindo assim o contacto apropriado dos ratos com os CNTs.

Na altura em que existiam ainda poucos registos de exposição ocupacional a CNTs, um estudo mostrou a viabilidade e características destes materiais que eram produzidos por agitação mecânica, na forma de aerossol. Neste estudo, aproximadamente  $50\mu\text{g}/\text{m}^3$  de CNTs foram produzidos e os tamanhos das partículas mudaram com o nível de agitação. No geral, foi observada uma distribuição bimodal dos tamanhos das partículas, com algumas destas a apresentarem diâmetros  $<100\text{nm}$  e as maiores, aproximadamente, 300-600 nm. (Maynard, Baron et al. 2004) Embora este estudo tenha utilizado SWCNTs, os mais recentes usam MWCNTs, pois estes materiais são produzidos em maiores volumes e podem-se obter em grandes quantidades e diferentes qualidades ao nível comercial. (Mitchell, Gao et al. 2007)

Num dos estudos realizados com SWCNTs instilados, verificou-se que a exposição a amostras de baixas e altas doses de concentração eram capazes de produzir granulomas epitelioides. Estas lesões foram observadas em maior número nos grupos sujeitos a doses mais elevadas de SWCNTs e durante um período de tempo mais arrastado (90 dias). A mortalidade também é referida num dos grupos que foi exposto a CNT carbolex, devido à congestão das vias aéreas, uma vez que os animais sujeitos a doses de alta concentração do SWCNT manifestaram uma agregação desta substância, fenómeno este que motiva uma desadequada dispersão pelo pulmão. Apesar de tudo, o granuloma foi mesmo a lesão pulmonar que mais proeminentemente se manifestou nas amostras em estudo. Esta informação sugere uma íntima ligação entre a elevada dose administrada/exposta e a probabilidade de distribuição e lesão pulmonar. Este conhecimento toma um lugar de destaque uma vez que os processos de produção e composição



**Figura 5-** Formação de colagénio após o depósito de SWCNTs no pulmão de ratos. Retirado de (NIOSH 2009)

não são ainda claros, indicando no entanto, uma precaução adicional para estes fenómenos. (Lam, James et al. 2004)

Foram feitas observações mais detalhadas relativamente à experiência anterior e verificou-se novamente a formação de granulomas nos pulmões dos ratos, concluindo-se mais uma vez que esta seria devido à presença de agregados de SWCNTs. Além disso, 24 horas após a exposição, observou-se uma resposta inflamatória mediada por neutrófilos, identificando-se ainda alguns marcadores de lesão celular (Lactato Desidrogenase [LDH]), pelo que se pôde registar ainda uma resposta fibrótica associada. Contudo, ao invés do que afirmava um outro estudo (Lam et al. 2004), este trabalho mostrou que o grupo de animais expostos ao quartzo apresentava uma resposta inflamatória e imune muito mais forte do que o grupo exposto a CNTs. (Warheit, Laurence et al. 2004) São conclusões um pouco paradoxais à luz dos conhecimentos da época, uma vez que os CNTs eram tidos como muito mais agressivos na invasão ao parênquima pulmonar.

Um outro estudo, utilizando a aspiração faríngea em vez da instilação intratraqueal, foi realizado com semelhantes grupos experimentais das anteriores observações, no entanto, as concentrações das amostras eram claramente inferiores. Ainda assim, as características patológicas registadas foram em muitos aspetos semelhantes. Especificamente, os SWCNTs geraram resposta inflamatória transitória que foi caracterizada por uma elevação dos macrófagos, 7 dias após ter cessado o processo inflamatório inicial. Ocorreu ainda um aumento da produção abrupto de citocinas pró-inflamatórias, caracterizado pelo aumento do TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e ainda pelo fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Os SWCNTs na forma agregada conseguiram produzir uma inflamação granulomatosa em torno de células epiteliais hipertrofiadas ao passo que para o mesmo composto na sua forma dispersa verificou-se um tropismo para o espaço alveolar, promovendo, neste caso, fibrose intersticial. Este estudo permitiu focar-se sobretudo

nas diferenças patológicas provocadas pelos SWCNTs agregados e dispersos aquando da sua exposição no pulmão. Os resultados dos estudos dos lavados broncoalveolares permitiram ainda observar a presença aumentada de proteínas, produtos de peroxidação lipídica e substâncias indicadoras de stresse oxidativo (depleção de glutatião e 4-hidroxinonenal). Estes registos bioquímicos sugerem assim que os SWCNTs induzem uma lesão e morte das células pulmonares associadas a stresse oxidativo, além de todas as outras alterações inflamatórias já descritas. (Shvedova, Kisin et al. 2005)

Também para os MWCNTs a via de exposição influencia de forma significativa as lesões pulmonares provocadas. Quando estes compostos são inalados verifica-se uma distribuição mais dispersa do que para uma exposição pela via intratraqueal. Observou-se ainda que os MWCNTs, quando estão em pequenos aglomerados, ao invés de provocarem inflamação celular, promovem o espessamento do espaço alveolar, indicando assim uma resposta com tendência fibrótica. Estas lesões patológicas desenvolvidas nos grupos que se sujeitaram à inalação mostraram diferenças quanto à lesão patológica com grupos sujeitos a outras formas de exposição, o que indica a importância do tamanho e via de exposição na distribuição dos CNTs dentro do pulmão. (Li, Li et al. 2007)

Uma outra observação muito importante aconteceu em animais sujeitos a MWCNTs após o período de exposição por inalação, nos quais não se verificou um aumento muito significativo do processo inflamatório no pulmão. No entanto, foram registados alguns efeitos sistémicos. Assim, destaca-se um aumento da resposta imunitária com supressão da resposta dos anticorpos células-T dependente, alterações da morte de células NK (natural killer), com aumentos do stresse oxidativo e da IL-10 (responsável pela supressão da resposta imune e pelo aumento da suscetibilidade a doenças e infeções). O autor crê que estas alterações se devam à capacidade dos

MWCNTs em contornar as defesas pulmonares intrínsecas e alcançarem a circulação, conseguindo mesmo chegar ao baço. (Stone 2009)

Muitos estudos permitem-nos perceber que a exposição a CNTs resulta numa rápida resposta inflamatória e fibrótica, com desenvolvimento de granulomas com agregados de CNTs, apesar de outros estudos contrariarem um pouco esta ideia. Talvez as diferenças de doses, das características físico-químicas, possam ser a chave para desfazer todas estas incongruências. (Stone 2009)

#### Exposição intraperitoneal e dérmica

Estudos piloto que fizeram um paralelo entre a toxicidade de vários tipos de MWCNTs e asbestos, revelaram uma resposta inflamatória, caracterizada pelo influxo de neutrófilos e exsudação de proteínas, conduzindo à formação de granulomas, aquando da injeção intraperitoneal das amostras. Esta resposta comum das duas partículas levou a concluir que os MWCNTs têm a capacidade de mostrar propriedades *asbestos-like*, dependentes da sua morfologia e comprimento. (Poland, Duffin et al. 2008) Uma outra experiência envolvendo MWCNTs, asbestos e fulerenos, que tinha como objetivo estudar a carcinogenicidade destes compostos, foi realizada com a administração dos produtos via intraperitoneal. Deste estudo resultou que os MWCNTs e os asbestos têm um enorme potencial carcinogénico, uma vez que se visualizaram mesoteliomas nos grupos expostos a estes dois produtos, ao passo que na população sujeita a fulerenos não ocorreram registos de qualquer tipo de tumor. (Takagi, Hirose et al. 2008) Assim, reconhece-se a elevada capacidade carcinogénica dos MWCNTs e dos asbestos na indução de tumores, quando utilizada a via injetável. (Stone 2009)

Quanto à exposição na pele, há um número limitado de estudos que sugere um perigo aumentado, associado à exposição aos CNTs, ocorrendo também uma resposta inflamatória

primária natural. Serão necessárias mais evidências futuras para se considerar uma avaliação sistémica no seguimento da exposição dérmica. A recorrente presença de granulomas quando se introduzem CNTs subcutâneos sugere que a patologia provocada por estes produtos não se resume ao sistema respiratório, mas sim a diferentes tipos de resposta que poderão ocorrer em muitos outros sistemas. Também se salienta o facto de poderem surgir respostas inflamatórias e stresse oxidativo na pele, como já se havia observado no pulmão, sendo por isso importante considerar-se esta via de exposição, quando se pretende fazer um estudo da toxicidade dos CNTs. (Yokoyama, Sato et al. 2005; Murray, Kisin et al. 2009)

#### Exposição cardiovascular e sua toxicidade

A exposição cardiovascular, considerada de elevada importância na avaliação de toxicidade, não servirá só para perceber os mecanismos inerentes à fisiopatologia que ocorre no sangue e seus constituintes, mas despoletará conclusões sobre órgãos-alvo que são tidos em conta quando se administram CNTs intravenosos. (Stone 2009)

Há poucas referências sobre a toxicidade cardiovascular induzida pelos CNTs por esta via, no entanto, da escassa bibliografia existente ressaltam perigos significativos associados. A normal capacidade desta via para tornar toda a exposição sistémica, faz com que os registos avaliados mostrem lesões em muitos locais do organismo. Assim, registaram-se lesões a nível hepático (avaliadas a partir de parâmetros bioquímicos – transaminases), tendo sido o pulmão outro dos locais eleitos para a lesão celular por parte dos CNTs. Um outro achado importantíssimo, e digno de registo, foi a capacidade destes desenvolverem trombose ao nível da artéria carótida, verificando-se um aumento da agregação plaquetar motivado pelos SWCNTs e MWCNTs. (Radomski, Jurasz et al. 2005; Li, Hulderman et al. 2007; Yang, Wang et al. 2008).

Toxicocinética - Absorção, Metabolismo, Distribuição e Eliminação*Absorção*

Terá sempre de se considerar o local onde é possível ocorrer a absorção de CNTs, devido à capacidade destes produtos em atingir órgãos alvo múltiplos, que são os locais onde se irão acumular e gerar toxicidade. Até agora, não há estudos que mostrem que os CNTs podem entrar em circulação partindo dos pulmões, pele ou trato gastrointestinal. Há apenas uma referência que revela que os MWCNTs aumentam a permeabilidade paracelular dos pulmões, permitindo assim uma grande transferência destes compostos do pulmão para o sangue. (Stone 2009)

*Metabolismo, Distribuição e Excreção.*

Não há qualquer referência ao metabolismo dos CNTs, no entanto, crê-se que este ocorre devido à normal biopersistência nos órgãos que os faz degradar.

Os registos existentes da distribuição dos CNTs indicam que, pela via intravenosa, os locais de destino privilegiados serão o fígado, os pulmões e o baço. (Yang, Wang et al. 2008)

A propensão que os CNTs têm para promover toxicidade nos locais de acumulação é uma área de grande interesse e relevância, sendo que conhecendo *a priori* os destinos preferidos destes compostos poder-se-á dar uma atenção especial para esses mesmos órgãos.

No que respeita à excreção, como é sabido, esta é responsável por tornar mais curta a longevidade das substâncias no interior do corpo e assim diminuir a sua toxicidade. Apesar de poucos estudos referirem as vias de excreção utilizadas pelos CNTs, sabe-se que após uma administração injetável destas substâncias, observou-se uma excreção evidente pela via renal, demonstrando que o tempo de semi-vida destes produtos no organismo dura cerca de 3 horas. (Singh, Pantarotto et al. 2006)

#### 5.4.2.2- Estudos *in vitro* da toxicidade dos CNTs

Os estudos *in vitro* têm sido usados com células do pulmão, da pele, do sistema cardiovascular e imune para investigar a toxicidade por CNTs. Contudo, não há qualquer registro de estudos *in vitro* do sistema nervoso central, gastrointestinal, rim ou fígado.

##### Modelos do pulmão, da pele, do sistema cardiovascular e imune

Uma grande variedade de tipos de células derivadas do pulmão revelou ser sensível à toxicidade por CNTs, manifestando-se num processo inflamatório, oxidativo e citotóxico exuberante. (Davoren, Herzog et al. 2007; Ye, Wu et al. 2009) Contudo, a toxicidade exibida, pela qual os CNTs são responsáveis, não é reproduzida consistentemente por diferentes investigadores e pode estar associada a características físico-químicas, ou devido ao próprio *set-up* utilizado na experiência (que engloba especificamente as células investigadas, a concentração de CNT ou o tempo de exposição). (Stone 2009)

Os estudos em modelos de pele sugerem que os processos inflamatórios e oxidativos estão relacionados com a resposta dos queratinócitos aos SWCNTs e MWCNTs. (Shvedova, Castranova et al. 2003; Nemmar, Hoylaerts et al. 2004). Contudo, estes mesmos registos foram realizados com o recurso a linhas de células simples. Assim, embora se possa reconhecer que os CNTs causem uma lesão dérmica, estes são também capazes de ter alguma suscetibilidade na penetração da pele. (Monteiro-Riviere, Inman et al. 2005)

No que respeita ao sistema cardiovascular, tendo como base o escasso número de estudos disponíveis, estes sugerem que os CNTs são capazes de promover respostas trombóticas e afetar a normal eletrofisiologia cardíaca. (Radomski, Jurasz et al. 2005) (Helfenstein, Miragoli et al. 2008) Além do mais, é atribuído aos CNTs o potencial de poderem iniciar ou fazer progredir alguns tipos de doenças cardiovasculares.

O conhecimento atual do sistema imunológico permite-nos antecipar-lhe um papel fundamental na remoção dos CNTs do corpo, como foi primariamente evidenciado pela contribuição das populações de macrófagos residentes, que foram captadas no local de exposição ao material ou nos órgãos alvo. (Dumortier, Lacotte et al. 2006; Poland, Duffin et al. 2008) Contudo, a eficiência deste processo tem de estar ligada às características específicas do CNT em causa, e não pode ser universalmente extrapolada para todos os compostos. (Dumortier, Lacotte et al. 2006) Além disso, o envolvimento de células imunológicas no desenvolvimento de granulomas enfatiza ainda mais a sua capacidade para contribuir para a patologia por CNTs. Reconhece-se ainda que a interferência com a função do sistema imune já foi demonstrada, e portanto, a capacidade dos CNTs para aumentar a suscetibilidade à infeção devem ser acompanhados de estudos *in vivo*. (Singh, Pantarotto et al. 2006)

#### **5.4.2.3- Mecanismos Biológicos da toxicidade a CNTs**

Um grande número de investigadores demonstrou que os CNTs são capazes de induzir toxicidade humana, que inclui uma resposta aguda inflamatória mediada por neutrófilos, stresse oxidativo, formação de granulomas e fibrose. Assim, já é possível retirar conclusões gerais sobre os mecanismos subjacentes a estes eventos. (Stone 2009)

##### Stresse oxidativo e inflamação

O stresse oxidativo está claramente implicado na indução da inflamação e associado a um nível sub-letal, pois ativa fatores de transcrição específicos (como é o caso de NF- $\kappa$ B) que partilha o gene codificador de citocinas pró-inflamatórias. As evidências experimentais sugerem que as consequências do stresse oxidativo são “graduais” em relação à agressão oxidativa, isto é, à medida que ocorre um aumento da agressividade, também a resposta se torna mais forte, que pode conduzir mesmo à morte celular. (Nel, Xia et al. 2006)

Alguns CNTs foram responsáveis pela indução *in vivo* de um aumento da produção de ERO's e/ou por uma depleção dos antioxidantes no pulmão e no coração (Shvedova, Kisin et al. 2005; Li, Hulderman et al. 2007), ao passo que elementos responsáveis por stresse oxidativo *in vitro* foram encontrados em modelos da pele (Shvedova, Castranova et al. 2003) e do pulmão (Manna, Sarkar et al. 2005).

A contribuição do stresse oxidativo está bem representada num ensaio realizado, no qual se administrou um pré-tratamento com antioxidantes a animais, tendo estes revelado uma capacidade de diminuir a resposta tóxica a SWCNTs. (Shvedova, Kisin et al. 2007)

Várias respostas inflamatórias têm sido identificadas em diferentes estudos realizados *in vivo* de CNTs, que incluem a exposição pulmonar a ratos (Muller, Huaux et al. 2005; Shvedova, Kisin et al. 2005), bem como a exposição intraperitoneal a estes mamíferos (Poland, Duffin et al. 2008). Nos estudos *in vitro*, uma variedade de tipos de células expostas a CNTs, incluindo queratinócitos (Monteiro-Riviere, Inman et al. 2005) e macrófagos têm revelado um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-8 e TNF- $\alpha$ . (Davoren, Herzog et al. 2007)

#### Formação de granulomas e fibrose

O desenvolvimento de granulomas tem também sido demonstrado em numerosas ocasiões, e é assim assumido como sendo uma resposta comum à exposição de CNTs. Um estudo que utilizou como *endpoint* a formação de granulomas na cavidade peritoneal distinguiu os diferentes potenciais patogénicos dentro dos CNTs, variando o seu tamanho e a sua morfologia. Os resultados sugeriram que os MWCNTs maiores e mais lineares são mais potentes do que os materiais pequenos e enrolados, aumentando assim o potencial patológico em causa. (Poland, Duffin et al. 2008)

Absorção de CNTs para a célula

Está bem claro que os CNTs têm um alto potencial de entrada numa ampla variedade de células, mas os mecanismos subjacentes ainda não são muito claros, com algumas evidências a suportar o mecanismo ativo endocitário e fagocitário. (Hirano, Kanno et al. 2008)

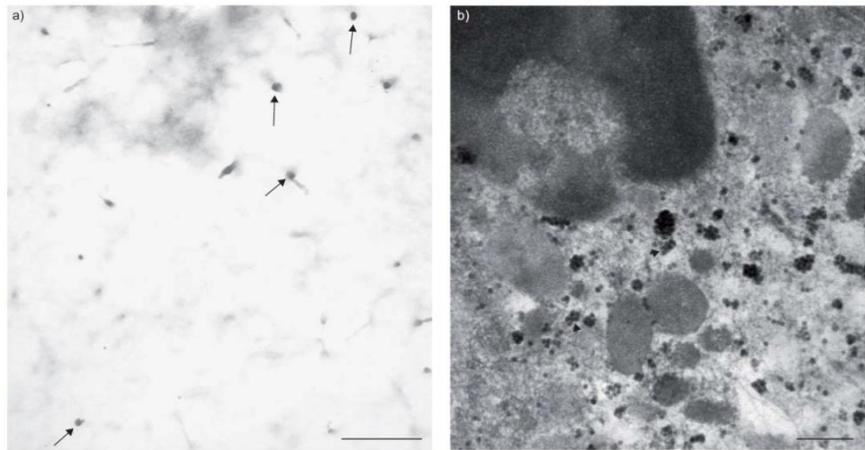
Talvez o método de transferência para o interior seja determinado pelo tipo de CNT, pela dispersão ou pelo tipo de célula em questão. Não é para já óbvio se esta entrada é necessária para induzir uma resposta celular, incluindo toxicidade, ou se apenas a interação com a superfície das células seja suficiente para isso. (Cherukuri, Bachilo et al. 2004)

## 5.5- Exposição ocupacional

### 5.5.1- Potencial para exposição ocupacional

Existem poucos registros nos locais de trabalho para exposição a nanopartículas do ar que são produzidas intencionalmente ou não, no processo industrial. É frequente que processos que trabalhem ou produzam nanomateriais em fase gasosa, ou que usem nanomateriais em pó ou suspensão/solução, coloquem os trabalhadores num maior risco devido à facilidade de libertação das nanopartículas. Além disso, a manutenção dos sistemas de produção (que inclui a limpeza e eliminação de materiais dos sistemas de filtração) é frequentemente associada a uma maior exposição, se envolver um distúrbio nos depósitos de nanomateriais.

No entanto, existem hoje registros de duas mortes em mulheres operárias chinesas, com 29 e 19 anos de idade, que estiveram expostas a nanopartículas de éster poliacrílico, durante 5-13 meses, sem qualquer medida de proteção. Ambas vieram a falecer com falência respiratória, cerca de 20 meses após o aparecimento dos sintomas. As doentes apresentavam diminuição da capacidade ventilatória e achados clínicos de derrames pericárdicos e pleurais tipo exsudato, como provável



**Figura 6-** Amostra pulmonar das doentes sujeitas a estudo, revelando nanopartículas com aproximadamente 30 nm de diâmetro, envoltas por tecido fibrótico. Retirado de (Song, Li et al. 2009)

resposta secundária à irritação química e física. Estas efusões foram achados frequentes e recorrentes após as toracocenteses e depois de instituída terapêutica que se revelaram inefetivas. Os achados patológicos encontrados nestas doentes dos quais são exemplos a inflamação não-específica, o infiltrado inflamatório e a fibrose pulmonar são consistentes com as lesões

produzidas em animais, quando expostos a nanopartículas com aproximadamente 30nm de diâmetro, a que estas doentes também tinham estado sujeitas. Pode-se assim inferir que as pacientes sofreram as mesmas lesões relatadas para as nanopartículas (com 30nm de diâmetro), por comparação com estes casos de toxicidade a nanomateriais observada nas experiências animais. (Song, Li et al. 2009)

Quando se trabalha com nanopoeiras, a magnitude da sua exposição depende do risco de partículas que são libertadas durante o manuseamento das mesmas. Investigadores do National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) estão a conduzir estudos que determinem quantitativamente como é que os vários nanomateriais se dispersam comparativamente. Estudos da exposição a SWCNTs indicaram que embora a matéria-prima possa libertar partículas visíveis no ar quando manuseada, o tamanho de aglomeração dessas partículas pode ser de poucos milímetros de diâmetro e a taxa de libertação de partículas inaláveis no ar baixa (tendo em conta o número e a massa) em comparação com outros nanopoeiras. No entanto, ao gerar-se energia para estes, verificaram-se níveis significativos desses mesmos pós respiráveis. (Maynard, Baron et al. 2004)

Como os dados respeitantes à geração de partículas inaláveis e respiráveis durante a produção e o uso de nanomateriais são escassos, mais informações serão necessárias para determinar a exposição sob várias condições.

Dispositivos compostos por nanoestruturas, tais como alguns circuitos integrados, representam um risco mínimo de exposição a nanopartículas durante o seu uso. Contudo, alguns dos processos utilizados no seu manuseamento, podem conduzir à exposição dessas partículas (por exemplo, a compostos de polimento que contêm partículas em nanoescala que são inadvertidamente dispersos ou criados durante a produção ou na manipulação desses objetos).

Da mesma forma, componentes à escala macro formados a partir de nanopartículas não irão ter, provavelmente, um potencial de exposição significativo. Contudo, se tais materiais forem usados ou manuseados de tal maneira que possam gerar partículas na forma “nanoestruturada” (por exemplo com o corte), ou se sofrem processos de transformação que conduzem a libertação de material em tamanho nano, poderá ocorrer de seguida uma exposição por inalação, ingestão e /ou penetração dérmica dessas mesmas partículas. (NIOSH 2009)

### **5.5.2- Fatores que afetam a exposição a nanopartículas**

Os fatores que afetam a exposição a nanomateriais incluem a quantidade de materiais usados e aqueles que facilmente se podem dispersar (no caso de pós), ou de sprays e gotículas no ar (no caso de suspensões). O nível de confinamento e duração do uso também irá influenciar a exposição. No caso de materiais no ar, o tamanho da partícula ou da gota irá determinar se o material pode ou não entrar no trato respiratório, local onde mais facilmente se poderá depositar. Partículas inaladas menores do que 10 $\mu$ m de diâmetro têm apenas alguma probabilidade de penetrar e ficar depositadas na região onde ocorrem as trocas gasosas do pulmão (alvéolo), mas há pelo menos 50% de probabilidade de partículas inferiores a 4 $\mu$ m de diâmetro de alcançarem estas mesmas regiões. As partículas que são capazes de se depositar nesta região do pulmão são as consideradas respiráveis. A fração de deposição de massa dessas nanopartículas mais pequenas é maior do que para as partículas respiráveis maiores, no trato respiratório humano. Mais de 50% de nanopartículas inaladas irão depositar-se nos alvéolos pulmonares. Para nanopartículas inaladas menores do que 30 nm (aproximadamente), um aumento da fração de massa das partículas é também preditivo do depósito no trato respiratório superior humano. (NIOSH 2009)

Atualmente não há informação suficiente que preveja todas as situações e cenários no local de trabalho que frequentemente conduzem à exposição por nanomateriais. Contudo, há alguns

fatores dos locais de trabalho que podem aumentar e potencializar essa mesma exposição. Estes incluem:

- Trabalhar com nanomateriais em meios líquidos sem proteção adequada (por exemplo, luvas) irá aumentar o risco de exposição da pele;
- Trabalhar com nanomateriais em meios líquidos durante operações de mistura ou vazamento, onde há um alto grau de agitação, poderá conduzir a uma alta probabilidade de gotículas inaláveis e respiráveis serem formadas;
- Gerar nanopartículas gasosas em sistemas não-fechados irá aumentar as hipóteses de libertação de aerossóis no local de trabalho;
- Manuseamento de nanopoeiras que poderá levar à possibilidade da sua aerossolização;
- Realizar a manutenção em equipamentos e processos utilizados para produzir ou fabricar nanomateriais, determinará um potencial risco de exposição para os seus trabalhadores no desempenho das suas tarefas;
- Limpar os sistemas de filtros usados para captar nanopartículas irá potencializar a exposição dérmica e respiratória.

### **5.5.3- Recomendações para o uso industrial de nanomateriais**

Os tipos de nanomateriais são diversos quanto à sua natureza física, química e biológica. Os processos utilizados nas pesquisas, desenvolvimento, produção e uso de nanomateriais, ou a sua introdução, têm um grande potencial de variabilidade. Até existirem mais informações disponíveis sobre os riscos possíveis de saúde ou das dimensões da exposição ocupacional para nanomateriais, devem ser desenvolvidas e implementadas medidas preventivas interinas. Estas ações devem focar-se no desenvolvimento de práticas de trabalho seguras, adaptadas a processos e materiais específicos quando os trabalhadores estão expostos. As informações que já se encontram disponíveis sobre os materiais comuns e que estão a ser produzidos na escala

nanométrica (por exemplo o TiO<sub>2</sub>) devem ser consideradas como um ponto de partida no desenvolvimento de práticas de trabalho e de controlo apropriadas. (NIOSH 2009)

As recomendações foram criadas de forma a ajudar na avaliação de perigo e no manuseamento de nanomateriais, de forma a reduzir as exposições nos locais de trabalho. Utilizar uma abordagem focada no perigo para avaliar as exposições e desenvolver medidas preventivas é consistente com as boas práticas de saúde e segurança ocupacional, que são recomendadas pela UK Royal Society e Royal Academy of Engineers.

#### **5.5.3.1- Procedimentos de controlo da exposição**

Dada a limitada informação sobre riscos de saúde associados com exposição ocupacional a nanopartículas, as boas práticas e o seu controlo na produção devem ser adaptadas aos processos e tarefas do trabalho em que a exposição poderá ocorrer.

Para muitas tarefas e processos de trabalho, o controlo da exposição para nanopartículas no ar pode frequentemente ser acompanhado do uso de uma ampla variedade de técnicas de engenharia semelhantes às que são utilizadas na redução de exposição para aerossóis em geral. Para se assegurar que os passos corretos estão a ser dados de forma a minimizar o risco de exposição, deve ser implementado um programa de gestão de riscos. Os elementos que tal programa deve incluir são, entre outras, o estabelecimento de recomendações para a avaliação e instalação de aplicadores de produção (por exemplo, ventilação), a educação e treino de trabalhadores no manuseamento de nanomateriais (por exemplo, boas práticas de trabalho) e o desenvolvimento de procedimentos para selecionar e usar equipamento de proteção individual (por exemplo, roupas, luvas, respiradores). Em anexo, encontra-se uma tabela com os vários tipos de equipamento de proteção individual usados no manuseamento de nanomateriais.

### **A- Aplicadores de produção**

Geralmente, os aplicadores de produção, como o invólucro de origem (por exemplo, os que isolam a fonte geradora do trabalhador) e o sistema de ventilação por exaustor local devem ser efetivos para captar nanopartículas do ar, baseado no que é conhecido sobre os movimentos e comportamentos destas no ar. Já existem registos sobre o uso de sistemas de ventilação que foram concebidos, testados e mantidos pela American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH 2001). À luz do atual conhecimento científico sobre a forma como se geram, transportam e captam aerossóis, estas técnicas são efetivas para controlar a exposição no ar a partículas em nanoescala. (Seinfeld and Pandis 1998; Hinds 1999)

#### Eficiência na colheita por filtros

A base de estudo atual indica que um sistema de ventilação bem projetado com uma alta eficiência para partículas do ar (HEPA) tem que dispor de filtros que sejam capazes de remover nanopartículas eficazmente. Os filtros são testados, utilizando partículas que têm uma baixa probabilidade de serem apanhadas (classicamente com cerca de 20nm de diâmetro). No entanto, é expectável que a eficiência para a filtração de partículas pequenas (à escala micro, por exemplo) exceda a destas partículas à escala nano. O NIOSH está levar a cabo estudos que validam a eficiência dos meios de filtração dos HEPA nos sistemas de controlo ambiental e nos respiradores de nanopartículas.

Se os filtros HEPA são usados nos sistemas de aspiração de partículas, estes devem ser bem acoplados de forma a obter uma boa caixa de filtração. Se estes estiverem instalados inapropriadamente, as nanopartículas têm potencial para atravessar o sistema, levando a uma eficiência de filtração muito mais baixa do que a prevista. (NIOSH 2009)

**B- Práticas de trabalho**

A introdução de boas práticas de trabalho num programa de gestão de risco pode ajudar a minimizar a exposição dos trabalhadores aos nanomateriais. Nos exemplos de boas práticas, incluem-se as seguintes:

- A zona de trabalho deve ser limpa no final de cada turno de trabalho (no mínimo), utilizando um aspirador de vácuo HEPA ou utilizando métodos de limpeza húmidos;
- As limpezas a seco ou com compressores de ar não devem ser utilizadas nas áreas de trabalho;
- A limpeza deve ser efetuada de forma a impedir o contacto dos trabalhadores com os resíduos, e a disposição destes deve estar de acordo com as leis nacionais e locais;
- O consumo ou armazenamento de alimentos ou bebidas nos locais de trabalho onde são manipulados os nanomateriais deve ser evitado;
- Deve ser providenciado aos trabalhadores um acesso fácil para a lavagem das mãos, encorajando e incentivando esta medida antes de realizarem as refeições, ou quando decidem fumar ou na hora em que deixam o local de trabalho;
- Deve existir um local para balneários, facilitando o acesso a chuveiros e espaços para mudança de roupa, de forma a não contaminar inadvertidamente outros locais (incluindo a própria casa), causada pela transferência de nanopartículas na pele e vestuário. (NIOSH 2009)

**C- Roupa de proteção pessoal**

Atualmente, não há recomendações disponíveis que selecionem roupas ou outro tipo de vestuário para prevenir a exposição da pele de nanopartículas. Estudos recentemente publicados têm mostrado eficiências muito diferentes na penetração das nanopartículas de 0,477 $\mu$ m de diâmetro para 8 tipos de tecidos distintos (que incluem tecidos, não tecidos e tecidos laminados),

registando-se valores de penetração de 0,0% a 33%, com uma média de 12%. Contudo, mesmo para poeiras em macro escala, é reconhecido que os equipamentos protetores da pele (por exemplo, fatos, luvas e outros vestuários de proteção) são muito limitados na sua efetividade na redução da exposição dérmica. Em todo o caso, embora as nanopartículas possam penetrar a epiderme, há poucos trabalhos que sugiram que essa via conduza à doença, sendo que nenhum padrão de exposição foi sequer proposto.

Alguns tipos de vestuário já incorporam testes com nanopartículas, fornecendo alguma informação da proteção efetiva destas no seu manuseamento. Apesar disso, o NIOSH está a planear realizar testes de investigação laboratorial sobre métodos de ensaio que determinem a penetração de partículas através tecidos utilizados em roupas e acessórios de proteção.

#### **D- Equipamento de proteção individual respiratório**

O uso de máscaras respiradoras é geralmente requerido quando os trabalhadores estão expostos a níveis de ar contaminado e cujo controlo técnico não é adequado, segundo os limites legais e os objetivos das normas internas. Atualmente, não há limites específicos de exposição para nanopartículas do ar, embora existam normas e recomendações para exposição ocupacional a materiais de maiores dimensões mas de composição química semelhante. (Ex. NIOSH, ACGIH 2001) Evidências científicas recentes indicam que as nanopartículas são mais reativas biologicamente do que partículas maiores ou de composição química semelhante e que conduzem a um maior risco quando inaladas. Para determinar a eficácia de controlos ou a necessidade de máscaras respiratórias, seria prudente considerar os limites e as recomendações de exposição atuais (ex. PELs) e o aumento de área de superfície das nanopartículas em comparação com aqueles outros materiais para os quais os limites e normas de exposição já estão desenvolvidos.

A decisão para instituir proteção respiratória deve ser baseada na combinação de uma decisão técnica feita por profissionais e tendo em conta os resultados dos estudos de perigo e gestão de risco recomendados em estudos de referência (exemplo, NIOSH). Se a exposição do trabalhador a nanopartículas no ar contínua a ser uma preocupação depois de se instituírem medidas de controlo, o uso de respiradores pode reduzir em maior escala essa mesma exposição. Diferentes classes de respiradores existentes podem fornecer diferentes níveis de proteção, quando devidamente testados e ajustados aos trabalhadores.

Quando os respiradores são pedidos de forma a serem utilizados no local de trabalho, há um programa conjunto que é seguido e que contempla:

- Uma avaliação da capacidade do trabalhador em desenvolver a sua atividade enquanto utiliza o respirador;
- Treino regular do pessoal;
- Monitorização do ambiente periodicamente;
- Teste de ajustamento do respirador e sua monitorização;
- Manutenção, inspeção, limpeza e armazenamento dos respiradores.

Estas normas contemplam também que a seleção dos respiradores seja feita por uma pessoa bem informada sobre o local de trabalho e das limitações próprias dos aparelhos.

#### **E- Limpeza e reciclagem dos nanomateriais**

Não há atualmente normas específicas disponíveis para a limpeza de nanomateriais derramados ou superfícies contaminadas. Até haver informação credível, seria prudente basear-se em estratégias de boas práticas correntes, de forma a lidar com os derrames e superfícies contaminadas, juntamente com informação disponível na bibliografia sobre riscos de exposição e a importância relativa das diferentes vias de exposição. A abordagem *standard* para a limpeza de

pós e líquidos derramados inclui o uso de aspiradores HEPA, limpeza molhada de pós, utilizando para o efeito panos humedecidas e aplicação de materiais absorventes.

O método de limpeza húmido com sabonetes e óleos é o melhor, sendo que os panos de limpeza ocupam lugar secundário nesta altura. A secagem e reutilização de toalhas contaminadas podem ainda resultar em dispersão de partículas, mas o uso de panos de limpeza eletrostáticos de microfibras podem também ser eficazes na remoção de partículas das superfícies com uma dispersão mínima para o ar.

Métodos de limpeza energéticos que incluem varrimento a seco ou o uso de ar comprimido devem ser evitados ou utilizados com a precaução necessária que assegure que as partículas em suspensão, aquando da limpeza, são captadas pelos meios de filtragem HEPA. Se a limpeza a vácuo for usada, devem ter-se cuidados indispensáveis para que os filtros sejam instalados corretamente e a mudança periódica destes e dos sacos de depósito seja feita de acordo com as recomendações do fabricante.

Enquanto as limpezas de vácuo provam que podem ser eficazes para muitas aplicações, deve-se estar atento para alguns aspetos:

- As forças de atração podem dificultar a entrada de partículas, quando se encontram em superfícies difíceis;
- A carga eletrostática de partículas fará com que estas sejam atraídas por cargas opostas e repelidas por partículas com a mesma carga. Um escova de vácuo com carga oposta, ou suas aplicações, podem repelir partículas tornando difícil captar aerossóis ou fazendo mesmo dispersá-los;

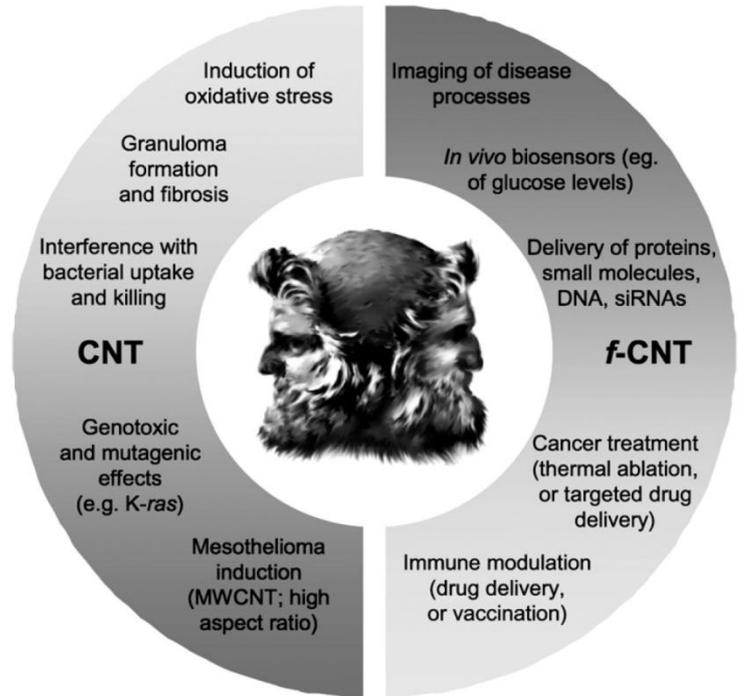
- A lavagem vigorosa com uma escova destas ou a fricção de altas taxas de fluxo de material ou de ar pode gerar uma carga. Por exemplo, para suplantar esta situação, os aspiradores de pó de impressoras e toners de copiadoras tem carga eletrostática neutra. (NIOSH 2009)

Enquanto se desenvolvem procedimentos de limpeza para nanomateriais derramados ou superfícies contaminadas, as atenções devem ser direcionadas para a exposição potencial que ocorre durante a sua limpeza. A exposição por inalação, ou então por contacto direto com a pele são aquelas que acarretarão maiores riscos, com toda a certeza. Mas para tudo isto, serão necessários mais estudos de forma a providenciar um melhor aconselhamento sobre equipamento pessoal de proteção. Em particular, a exposição por via inalatória de materiais estará influenciada pela probabilidade de re-aerossolização. Neste contexto, é necessária uma hierarquização do potencial de exposição, com os materiais em pó a apresentarem um maior potencial do que os líquidos e estes, por seu turno, um maior potencial do que materiais encapsulados ou estruturas e nanomateriais imóveis.

Em suma, caso algum material seja derramado ou alguma superfície contaminada, os princípios a seguir são aqueles que estão descritos nas normas nacionais ou locais, caso existam, sobre manuseamento e reciclagem de material de limpeza.

**6- Conclusão**

Na mitologia Romana, Janus era o deus dos portões e das portas, do Início, e do Fim. Janus era normalmente retratado com duas cabeças que olhavam em direções opostas, e frequentemente costumava simbolizar a mudança e as transições, tal como a progressão do passado para o futuro e de uma condição ou visão para outra. Também era conhecido por representar o tempo, porque era capaz de ver o passado com uma das suas cabeças e o futuro com a outra. Como pode a figura mitológica de Janus relatar a emergência das nanotecnologias e a explosão das NCIs na nanomedicina e no dia a dia das pessoas?



**Figura 7-** NCIs com propriedades Janus-like. Retirado de (Shvedova, Kisin et al. 2009)

Facilmente se pode inferir que existe um paradoxo entre tudo aquilo que se considera positivo com o surgimento desta nova gama de materiais e suas aplicações, em contraponto com os problemas de saúde inerentes à sua exposição. A minimização de todo este processo terá que nos ser dada por um estudo exaustivo da nanotoxicologia e por parte dos seus investigadores.

A nanotoxicologia é um campo que tem sido impulsionado para a ribalta da ciência, da especulação e da crescente pressão para o desenvolvimento de materiais em produtos novos e não existentes. Este novo patamar da ciência é claro – as investigações mostram que o tamanho, a forma, a composição química e outros parâmetros físico-químicos dos objetos afetam a forma como este interagem com os sistemas biológicos e o impacto que têm. Neste momento, a

singularidade do prefixo “nano” neste campo não é assim tão clara. O tamanho importa, isso é indubitável! Mas décadas de investigação têm demonstrado que o tamanho das partículas tem relevância na escala micrométrica quando se trata de saúde humana, bem como em nanoescala, levantando a questão de saber se a toxicidade nanomaterial pode ser entendida como uma extensão do que conhecemos sobre materiais de maior escala, ou se há algo único no interagir dos materiais em nanoescala com a biologia que justifique destacá-los. As pesquisas realizadas nos últimos 20 anos mostraram que materiais à escala nanométrica podem revelar toxicidade não expectável e incomum, sendo a complexidade físico-química um importante mediador da mesma à nanoescala.(Shvedova, Kisin et al. 2009)

Mas isto também nos mostra que estamos ainda longe de desenvolver um conhecimento preciso de como estes parâmetros regem os mecanismos de interação ou como é que eles são associados empiricamente com a resposta. De facto, a combinação da química e a forma dos materiais são importantes aspetos na avaliação de entrada no organismo, mas os indicadores de risco emergentes são bem mais complexos do que a simples escala de tamanho.

Os desafios que nos irão ajudar a compreender como é que a forma e a composição química gerem a toxicidade, irão tornar-se cada vez mais evidentes, da mesma forma que as tecnologias emergentes nos conduzem a novos e mais sofisticados materiais. Esta é uma situação crítica, tendo em conta que grandes quantidades de novas terapêuticas estão a ser projetadas à nanoescala, sendo assim introduzidas no corpo humano. Há ainda outras vias pelas quais os humanos continuam sujeitos à entrada destes novos materiais no corpo humano, como componentes de alimentos, ou durante a produção industrial, ou no uso de produtos que contêm estas substâncias.

Os materiais inovadores do futuro são mais propensos a assemelham-se com dispositivos complexos de engenharia à escala humana, do que com simples entidades químicas. Isto

significa que é necessária uma abordagem mais sofisticada e mais baseada nos sistemas de forma a melhor avaliar a sua toxicidade e os seus potenciais riscos.

Ao mesmo tempo, há um desafio paralelo e de certa forma interligado – a toxicologia quantitativa e avaliação de riscos não são capazes de acompanhar o desenvolvimento acelerado dos materiais emergentes, ou seja, haverá uma lacuna de conhecimento cada vez maior entre os materiais que estão a ser produzidos e o conhecimento necessário que garanta a sua utilização segura.

Preencher esta lacuna exigirá novas abordagens de avaliação do risco, para assim se poderem tomar novas decisões face aos seus potenciais, uma vez que as informações atuais são incompletas sobre a sua exposição, risco e resposta. Dada a natureza dinâmica de como os materiais emergentes são gerados, usados, descartados e reciclados, estas abordagens têm de ser estabelecidas dentro de um quadro próprio de ciclo de vida.

“Se quisermos enfrentar o desafio de garantir a utilização segura desta nova geração de substâncias é hora de ir além da nanotoxicologia, é tempo de rumar em direção a uma nova toxicologia de materiais sofisticados.” (Maynard, Warheit et al. 2011)

7- Anexo

Categoria do equipamento de proteção pessoal	Tipos específicos disponíveis	Características adicionais
<b>Luvas</b>	Luvas de trabalho	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barreira parcial para nanopoeiras;</li> <li>• Proteção limitada contra nanopartículas em suspensão;</li> <li>• As nanopartículas podem penetrar ou migrar através do tecido das luvas.</li> </ul>
	Luvas espessas, reutilizáveis e químio-resistentes; muitos materiais disponíveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boa proteção contra a exposição a salpicos e imersões com nanopartículas em suspensão;</li> <li>• Útil em operações de produção.</li> </ul>
	Luvas de latex ou nitrilo finas e descartáveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto nível de destreza dos dedos;</li> <li>• Ideal para trabalho de laboratório;</li> <li>• Pode ser utilizado por baixo de luvas de trabalho ou de luvas químio-resistentes mais grossas.</li> </ul>
<b>Roupa de proteção</b>	Bata de laboratório	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege o vestuário e a pele da deposição direta a nanopartículas do ar ou do contacto com nanopoeiras;</li> <li>• As nanopartículas podem penetrar ou migrar através dos tecidos.</li> </ul>
	Avental líquido-resistente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege a roupa de salpicos e sprays com nanopartículas em suspensão;</li> <li>• Cobertura normalmente mais forte para a frente do corpo e mais fraca para a zona lateral e traseira.</li> </ul>
	Fato descartável	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege a pele e a roupa das nanopartículas e nanopoeiras do ar;</li> <li>• Fornece proteção contra pequenas quantidades de salpicos com nanopartículas em suspensão.</li> <li>• Pode apresentar toucas e proteção para os pés integrados.</li> </ul>
<b>Proteção ocular</b>	Óculos de proteção	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege contra pequenos salpicos diretos com nanopartículas em suspensão;</li> <li>• Inadequado para a proteção contra grandes salpicos e sprays uma vez que os óculos não se ajustam bem à cara.</li> <li>• Fornece proteção contra impactos.</li> </ul>
	Óculos de proteção ajustados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege os olhos contra salpicos e sprays com nanopartículas em suspensão e contra exposições secundárias a líquidos na cara.</li> <li>• Óculos não ventilados evitam qualquer penetração de líquidos para o seu interior.</li> </ul>
	Protetores faciais	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protege toda a cara contra salpicos diretos com nanopartículas em suspensão;</li> <li>• Proteção limitada contra sprays uma vez que o protector não fica totalmente ajustado à cara.</li> </ul>
<b>Proteção respiratória</b>	Máscara respiratória de filtragem descartável	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ideal para tarefas de curta duração;</li> <li>• N95 é a referência mais comum;</li> <li>• Normalmente, é a proteção respiratória mais rapidamente aceite pelos utilizadores.</li> </ul>
	Respiradores purificadores de ar elastoméricos em meia máscara ou máscara total	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O ajuste da máscara pode ser feito facilmente, cada vez que o utilizador coloca o respirador;</li> <li>• A máscara total fornece proteção aos olhos para além da proteção respiratória;</li> <li>• Os cartuchos dos filtros são menos susceptíveis de se danificarem em comparação com a máscara respiratória de filtragem.</li> </ul>
	Respirador purificador de ar alimentado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fornece um alto nível de proteção com um ajuste a toda a área da cara;</li> <li>• Os trabalhadores podem utilizar toucas próprias, capacetes e peças de rosto caso tenham pêlos ou cicatrizes faciais;</li> <li>• Os cartuchos dos filtros são menos susceptíveis de se danificarem em comparação com a máscara respiratória de filtragem.</li> </ul>

**Tabela 2-** Tipos de equipamento de proteção individual usados no manuseamento de nanomateriais. Adaptado de (Ryman-Rasmussen, Riviere et al. 2006).

## 8- Referências

- Allhoff, F., P. Lin, et al. (2010). What is nanotechnology and why does it matter? : from science to ethics. Chichester, UK ; Malden, MA, Wiley- Blackwell.
- Aschberger, K., H. J. Johnston, et al. (2010). "Review of fullerene toxicity and exposure--appraisal of a human health risk assessment, based on open literature." Regul Toxicol Pharmacol **58**(3): 455-473.
- Baker, G. L., A. Gupta, et al. (2008). "Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles." Toxicol Sci **101**(1): 122-131.
- Chen, B. X., S. R. Wilson, et al. (1998). "Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10809-10813.
- Chen, H. H., C. Yu, et al. (1998). "Acute and subacute toxicity study of water-soluble polyalkylsulfonated C60 in rats." Toxicol Pathol **26**(1): 143-151.
- Chen, J., M. Tan, et al. (2006). "Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats: effect of lipopolysaccharide." Toxicology **222**(3): 195-201.
- Cherukuri, P., S. M. Bachilo, et al. (2004). "Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells." J Am Chem Soc **126**(48): 15638-15639.
- Davoren, M., E. Herzog, et al. (2007). "In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells." Toxicol In Vitro **21**(3): 438-448.
- Donaldson, K. and P. J. Borm (1998). "The quartz hazard: a variable entity." Ann Occup Hyg **42**(5): 287-294.
- Donaldson, K. and V. Stone (2003). "Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles." Ann Ist Super Sanita **39**(3): 405-410.
- Dumortier, H., S. Lacotte, et al. (2006). "Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells." Nano Lett **6**(7): 1522-1528.
- Elder, A., R. Gelein, et al. (2006). "Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system." Environ Health Perspect **114**(8): 1172-1178.
- Ferin, J., G. Oberdorster, et al. (1992). "Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats." Am J Respir Cell Mol Biol **6**(5): 535-542.
- Folkmann, J. K., L. Risom, et al. (2009). "Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes." Environ Health Perspect **117**(5): 703-708.
- Fujita, K., Y. Morimoto, et al. (2009). "Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C60 fullerene particles." Toxicology **258**(1): 47-55.
- Gharbi, N., M. Pressac, et al. (2005). "[60]fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity." Nano Lett **5**(12): 2578-2585.
- Gwinn, M. R. and V. Vallyathan (2006). "Nanoparticles: health effects--pros and cons." Environ Health Perspect **114**(12): 1818-1825.
- Helfenstein, M., M. Miragoli, et al. (2008). "Effects of combustion-derived ultrafine particles and manufactured nanoparticles on heart cells in vitro." Toxicology **253**(1-3): 70-78.
- Hirano, S., S. Kanno, et al. (2008). "Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages." Toxicol Appl Pharmacol **232**(2): 244-251.
- Jain, K. K. (2007). "Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system." Neurodegener Dis **4**(4): 287-291.
- Johnston, H. J., G. R. Hutchison, et al. (2010). "The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity." Toxicol Sci **114**(2): 162-182.
- Kagan, V. E., Y. Y. Tyurina, et al. (2006). "Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron." Toxicol Lett **165**(1): 88-100.
- Kamat, J. P., T. P. Devasagayam, et al. (2000). "Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications." Toxicology **155**(1-3): 55-61.

- Kayat, J., V. Gajbhiye, et al. (2011). "Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report." Nanomedicine **7**(1): 40-49.
- Kelly, R. J. (2009). "Occupational medicine implications of engineered nanoscale particulate matter." Journal of Chemical Health and Safety **16**(1): 24-39.
- Kreyling, W. G., M. Semmler, et al. (2002). "Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low." J Toxicol Environ Health A **65**(20): 1513-1530.
- Lademann, J., H. Weigmann, et al. (1999). "Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **12**(5): 247-256.
- Lam, C. W., J. T. James, et al. (2006). "A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks." Crit Rev Toxicol **36**(3): 189-217.
- Lam, C. W., J. T. James, et al. (2004). "Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation." Toxicol Sci **77**(1): 126-134.
- Li, J. G., W. X. Li, et al. (2007). "Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation." Environ Toxicol **22**(4): 415-421.
- Li, Z., T. Hulderman, et al. (2007). "Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes." Environ Health Perspect **115**(3): 377-382.
- Liao, C. M., Y. H. Chiang, et al. (2009). "Assessing the airborne titanium dioxide nanoparticle-related exposure hazard at workplace." J Hazard Mater **162**(1): 57-65.
- Lockman, P. R., R. J. Mumper, et al. (2002). "Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier." Drug Dev Ind Pharm **28**(1): 1-13.
- Magrez, A., S. Kasas, et al. (2006). "Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials." Nano Lett **6**(6): 1121-1125.
- Manna, S. K., S. Sarkar, et al. (2005). "Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes." Nano Lett **5**(9): 1676-1684.
- Maynard, A. D., P. A. Baron, et al. (2004). "Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material." J Toxicol Environ Health A **67**(1): 87-107.
- Maynard, A. D., D. B. Warheit, et al. (2011). "The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond." Toxicol Sci **120** Suppl 1: S109-129.
- McClellan, R. O. (1994). "Assessing health risks of synthetic vitreous fibers: an integrative approach." Regul Toxicol Pharmacol **20**(3 Pt 2): S121-134.
- Menon, G. K. and P. M. Elias (1997). "Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum." Skin Pharmacol **10**(5-6): 235-246.
- Menon, G. K., N. Kollias, et al. (2003). "Ultrastructural evidence of stratum corneum permeabilization induced by photomechanical waves." J Invest Dermatol **121**(1): 104-109.
- Mercer, R. R., J. Scabillon, et al. (2008). "Alteration of deposition pattern and pulmonary response as a result of improved dispersion of aspirated single-walled carbon nanotubes in a mouse model." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(1): L87-97.
- Mitchell, L. A., J. Gao, et al. (2007). "Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes." Toxicol Sci **100**(1): 203-214.
- Monteiro-Riviere, N. A., A. O. Inman, et al. (2005). "Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes." Nanomedicine **1**(4): 293-299.
- Monteiro-Riviere, N. A., R. J. Nemanich, et al. (2005). "Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes." Toxicol Lett **155**(3): 377-384.
- Mori, T., H. Takada, et al. (2006). "Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis." Toxicology **225**(1): 48-54.

- Muller, J., F. Huaux, et al. (2005). "Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes." Toxicol Appl Pharmacol **207**(3): 221-231.
- Murr, L. E., K. M. Garza, et al. (2005). "Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment." Int J Environ Res Public Health **2**(1): 31-42.
- Murray, A. R., E. Kisin, et al. (2009). "Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes." Toxicology **257**(3): 161-171.
- Nel, A., T. Xia, et al. (2006). "Toxic potential of materials at the nanolevel." Science **311**(5761): 622-627.
- Nemmar, A., P. H. Hoet, et al. (2002). "Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans." Circulation **105**(4): 411-414.
- Nemmar, A., M. F. Hoylaerts, et al. (2002). "Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model." Am J Respir Crit Care Med **166**(7): 998-1004.
- Nemmar, A., M. F. Hoylaerts, et al. (2004). "Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects." Toxicol Lett **149**(1-3): 243-253.
- Nielsen, G. D., M. Roursgaard, et al. (2008). "In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives." Basic Clin Pharmacol Toxicol **103**(3): 197-208.
- NIOSH (2009). Approaches to Safe Nanotechnology Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials, Department of Health and Human Services.
- NSW, W. (2007). Nanotechnology Occupational Health and Safety Overview. W. N. S. W. Government. workcover publications hotline: 26.
- Nurkiewicz, T. R., D. W. Porter, et al. (2008). "Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction." Part Fibre Toxicol **5**: 1.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, et al. (2004). "Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain." Inhal Toxicol **16**(6-7): 437-445.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, et al. (2002). "Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats." J Toxicol Environ Health A **65**(20): 1531-1543.
- Park, E. J., H. Kim, et al. (2010). "Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice." Toxicol Appl Pharmacol **244**(2): 226-233.
- Poland, C. A., R. Duffin, et al. (2008). "Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study." Nat Nanotechnol **3**(7): 423-428.
- Radomski, A., P. Jurasz, et al. (2005). "Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis." Br J Pharmacol **146**(6): 882-893.
- Ramachandran, G. and M. Schaub (2011). Assessing Nanoparticle Risks to Human Health, Elsevier Science.
- Roursgaard, M., S. S. Poulsen, et al. (2008). "Polyhydroxylated C60 fullerene (fullerenol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice." Basic Clin Pharmacol Toxicol **103**(4): 386-388.
- Rouse, J. G., J. Yang, et al. (2006). "Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes." Toxicol In Vitro **20**(8): 1313-1320.
- Ryman-Rasmussen, J. P., J. E. Riviere, et al. (2006). "Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties." Toxicol Sci **91**(1): 159-165.
- Sadauskas, E., H. Wallin, et al. (2007). "Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism." Part Fibre Toxicol **4**: 10.
- Savolainen, K., H. Alenius, et al. (2010). "Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies--a review." Toxicology **269**(2-3): 92-104.
- Sayes, C. M., A. M. Gobin, et al. (2005). "Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation." Biomaterials **26**(36): 7587-7595.
- Sayes, C. M., A. A. Marchione, et al. (2007). "Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles." Nano Lett **7**(8): 2399-2406.
- Sayes, C. M., K. L. Reed, et al. (2007). "Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles." Toxicol Sci **97**(1): 163-180.

- Semmler-Behnke, M., S. Takenaka, et al. (2007). "Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium." *Environ Health Perspect* **115**(5): 728-733.
- Shvedova, A. A., V. Castranova, et al. (2003). "Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells." *J Toxicol Environ Health A* **66**(20): 1909-1926.
- Shvedova, A. A., E. R. Kisin, et al. (2005). "Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(5): L698-708.
- Shvedova, A. A., E. R. Kisin, et al. (2007). "Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice." *Toxicol Appl Pharmacol* **221**(3): 339-348.
- Shvedova, A. A., E. R. Kisin, et al. (2009). "Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus?" *Pharmacol Ther* **121**(2): 192-204.
- Singh, R., D. Pantarotto, et al. (2006). "Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3357-3362.
- Song, Y., X. Li, et al. (2009). "Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma." *Eur Respir J* **34**(3): 559-567.
- Song, Y., X. Li, et al. (2009). "Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma." *European Respiratory Journal* **34**: 9.
- Stone, V. (2009). Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety-ENRHES. E. N. University. Edinburgh. **Edinburgh Napier University**.
- Takagi, A., A. Hirose, et al. (2008). "Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube." *J Toxicol Sci* **33**(1): 105-116.
- Takenaka, S., E. Karg, et al. (2001). "Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats." *Environ Health Perspect* **109 Suppl 4**: 547-551.
- Tsuchiya, T., I. Oguri, et al. (1996). "Novel harmful effects of [60]fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo." *FEBS Lett* **393**(1): 139-145.
- Tsuchiya, T., Y. N. Yamakoshi, et al. (1995). "A novel promoting action of fullerene C60 on the chondrogenesis in rat embryonic limb bud cell culture system." *Biochem Biophys Res Commun* **206**(3): 885-894.
- Wang, I. C., L. A. Tai, et al. (1999). "C(60) and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation." *J Med Chem* **42**(22): 4614-4620.
- Warheit, D. (2007). "How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization?" *Toxicological Sciences* **101**: 3.
- Warheit, D. B., B. R. Laurence, et al. (2004). "Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats." *Toxicol Sci* **77**(1): 117-125.
- Wick, P., P. Manser, et al. (2007). "The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity." *Toxicol Lett* **168**(2): 121-131.
- Xia, X. R., N. A. Monteiro-Riviere, et al. (2010). "Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C60) topically exposed in industrial organic solvents." *Toxicol Appl Pharmacol* **242**(1): 29-37.
- Xiao, L., H. Takada, et al. (2006). "The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes." *Bioorg Med Chem Lett* **16**(6): 1590-1595.
- Yamago, S., H. Tokuyama, et al. (1995). "In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: 14C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity." *Chem Biol* **2**(6): 385-389.
- Yamawaki, H. and N. Iwai (2006). "Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(6): C1495-1502.
- Yang, S. T., X. Wang, et al. (2008). "Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice." *Toxicol Lett* **181**(3): 182-189.
- Ye, S. F., Y. H. Wu, et al. (2009). "ROS and NF-kappaB are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes." *Biochem Biophys Res Commun* **379**(2): 643-648.

- Yin, J. J., F. Lao, et al. (2009). "The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials." Biomaterials **30**(4): 611-621.
- Yokoyama, A., Y. Sato, et al. (2005). "Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats." Nano Lett **5**(1): 157-161.
- Yoshida, S., K. Hiyoshi, et al. (2009). "Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice." Int J Androl **32**(4): 337-342.
- Zartarian, V., T. Bahadori, et al. (2005). "Adoption of an official ISEA glossary." J Expo Anal Environ Epidemiol **15**(1): 1-5.