



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Patrícia Pereira Cardoso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Comet Assay for Nanotoxicology Assessment –Nanoparticles Genotoxicity Testing” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Andrade, Dra. Ana Brandão e da Professora Doutora Eliana Souto apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Sara Patrícia Pereira Cardoso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Comet Assay for Nanotoxicology Assessment – Nanoparticles Genotoxicity Testing*” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação de Dra. Ana Andrade, Dra. Ana Brandão e Professora Doutora Eliana Souto, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

## Declaração de Autoria

Eu, Sara Patrícia Pereira Cardoso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014209061, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Comet Assay for Nanotoxicology Assessment - Nanoparticles Genotoxicity Testing” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 06 de setembro de 2019.

Sara Patrícia Pereira Cardoso

(Sara Patrícia Pereira Cardoso)

## **Agradecimentos**

Nesta última etapa dos meus 5 anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, resta-me agradecer a todos aqueles que fizeram destes anos os melhores da minha vida até agora e que sem os mesmos não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus orientadores de estágio Dra. Ana Andrade (*Owlpharma*), Dra. Ana Brandão (*Farmácia dos Olivais*), colegas de estágio Diogo Dias, João Paulo, Marta Roque e Rita Ladeira e restante equipa da Owlpharma e da Farmácia dos Olivais. A vocês obrigada pela paciência, pelo carinho, pela ajuda e pelos conhecimentos adquiridos convosco, que certamente irão fazer de mim uma pessoa melhor.

À minha distinta orientadora Professora Doutora Eliana Souto, por toda o auxílio na elaboração da monografia, por todo o apoio e excelência e por me ter presenteado com este desafio.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela sua exímia contribuição no meu percurso académico e profissional e por todas as competências e conhecimentos adquiridos na mesma.

Ao Núcleo de Estudantes de Farmácia da Associação Académica de Coimbra (NEF/AAC), por me ter dado grandes amizades e sobretudo por me ter mostrado que o associativismo faz-nos crescer tanto a todos os níveis.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra. Nunca a palavra “Saudade” fez mais sentido. Não há palavras suficientes para agradecer tudo aquilo que fizeram por mim, por todo o carinho e dedicação para comigo. Todas as aventuras que vivi convosco, todas as experiências, aprendizagens e momentos, levo para a vida. Sei que cresceram comigo também e tornaram o meu percurso inesquecível.

Aos meus colegas e amigos de curso, Cátia Cunha, Beatriz Gama, Beatriz Abreu, Constança Oliveira, Luísa Meda, Diana Costa, Marta Roque, Jéssica Almeida, Diogo Dias, Adriana Dias, Jéssica Oliveira, Raquel Chá-Chá, Ana Margarida Sequeira, Vanessa Almeida por estarem sempre lá quando preciso, por serem um apoio constante. Sem vocês nada disto seria possível.

À minha família de praxe. Aos meus queridos padrinhos, Ana Catarina, André Monteiro, Catarina Pires e Rafael Loureiro, que me ensinaram para nunca desistir e para nunca me deixar levar pela monotonia da vida. E aos meus prediletos afilhados que me enchem o coração Daniela Pinto, João Pedro Batista, Carolina Rodrigues, Diogo Castro, Rui Leonardo, Margarida Alberto, Manuel Silva e Rafael Ferreira. Sou tão feliz convosco!

Aos meus pais e irmãos. Vocês que fazem tudo por mim sem receber nada em troca, vocês são o meu núcleo, a minha inspiração, a razão pela qual sou o que sou hoje. Em vocês tenho o maior orgulho e espero um dia conseguir retribuir tudo o que fizeram por mim! Um obrigada muito especial a ti, Rosarinho!

E por último, mas não menos importante, a Ti Coimbra, que em Ti entramos pequeninos e saímos grandes, a Ti que me deste os melhores anos da minha vida e que sei que não os irei viver novamente. Obrigada pela oportunidade de fazer parte da Tua tradição. Realmente os “sonhos nascem aqui”.

A todos vós o meu mais intenso e profundo,

**OBRIGADO!**

“You must be the change you wish to see in the world (...) Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever”

*Mahatma Gandhi*

## ÍNDICE

### Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas e Acrónimos.....	11
1. Introdução.....	12
2. OWLPHARMA – Consulting Lda.....	13
3. Análise SWOT.....	13
3.1. Pontos Fortes.....	13
3.1.1. Integração na Equipa.....	13
3.1.2. Versatilidade de Tarefas/Funções.....	14
3.1.3. Desenvolvimento de Competências/Soft-Skills.....	15
3.1.4. Autonomia/Responsabilidade.....	15
3.2. Pontos Fracos.....	16
3.2.1. Qualidade de Tarefas.....	16
3.2.2. Feedback.....	16
3.2.3. Abrangência a Departamentos Específicos.....	16
3.3. Oportunidades.....	17
3.3.1. Conhecimento da Área de Consultoria Farmacêutica.....	17
3.3.2. Formações Internas.....	17
3.4. Ameaças.....	17
3.4.1. Compatibilidade com Estágio Curricular Obrigatório.....	17
4. Conclusão.....	18
Referências Bibliográficas.....	19

### Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas e Acrónimos.....	21
1. Introdução.....	22
2. Farmácia dos Olivais.....	22
3. Análise SWOT.....	23
3.1. Pontos Fortes.....	23
3.1.1. Equipa da Farmácia dos Olivais.....	23
3.1.2. Planeamento do Estágio no Desenvolvimento de Competências e Capacidades.....	24
3.1.3. Horário Privilegiado.....	25

3.1.4. Serviços Farmacêuticos, Apoio a Causas e Colaboração com Projetos.....	26
3.2. Pontos Fracos.....	26
3.2.1. Preparação de Manipulados.....	26
3.2.2. Autonomia no Atendimento .....	26
3.3. Oportunidades.....	27
3.3.1. Ações de Educação e Promoção para a Saúde .....	27
3.3.2. Formações Internas.....	27
3.4. Ameaças .....	28
3.4.1. Dispositivos Médicos e Produtos de Uso Veterinário.....	28
3.4.2. Organismos e Entidades de Comparticipação .....	28
4. Conclusão .....	29
Referências Bibliográficas.....	30
Anexos.....	31
Casos Clínicos .....	31
Caso I – Substitutos de Nicotina para Cessação Tabágica.....	31
Caso II – Pílula do Dia Seguinte .....	31

**Monograph “Comet Assay for Nanotoxicology Assessment – Nanoparticles Genotoxicity Testing”**

Resumo.....	34
Abstract.....	35
List of Abbreviations and Acronyms.....	36
1. Introduction .....	39
2. The Comet Assay: An Overview .....	40
a) Microscope Slides Preparation.....	42
b) Lysis of Cells.....	43
c) Alkali Unwinding.....	44
d) Electrophoresis.....	44
e) Neutralization of Alkali .....	44
f) DNA Staining and Comet Visualization .....	44
g) Comet Scoring.....	45
2.1. The Comet Assay: Modifications for a Purpose .....	46
2.2. The Comet Assay: Possible Limitations for Nanoparticles .....	47
3. Nanotoxicology Assessment.....	48
3.1. Oral Nanoformulations.....	49



	Poly(Anhydride) Nanoparticles .....	49
	Magnesium Oxide Nanoparticles .....	50
	Solid Lipid Nanoparticles .....	51
3.2.	Skin Nanoformulations .....	53
	Titanium Dioxide Nanoparticles .....	53
	Quantum Dots .....	54
	Zinc Oxide Nanoparticles .....	55
3.3.	Inhaled Nanoformulations.....	56
	Carbon Black Nanoparticles .....	56
	Gold Nanoparticles .....	57
3.4.	Ocular Nanoformulations .....	58
	Zinc Oxide Nanoparticles .....	58
	Cerium Oxide Nanoparticles.....	59
3.5.	Parenteral Nanoformulations.....	60
	Silver Nanoparticles .....	60
	Titanium Dioxide Nanoparticles .....	62
	Iron Oxide Nanoparticles .....	62
4.	Conclusions and Future Perspectives .....	63
	Bibliographic References.....	65

---

# Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

***OWLPHARMA – CONSULTING Lda.***

---

Relatório de Estágio referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Ana Margarida Silva Andrade, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

## Lista de Abreviaturas e Acrónimos

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
DOC	<i>Document</i>
eCTD	<i>Electronic Common Technical Document</i>
ERA	<i>Environmental Risk Assessment</i>
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FIs	Folhetos Informativos
IPN	Instituto Pedro Nunes
MedDRA	<i>Medical Dictionary for Regulatory Activities</i>
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PDF	<i>Portable Document Format</i>
PSUR	<i>Periodic Safety Update Report</i>
QRD	<i>Quality Review of Documents</i>
RAM	Reações Adversas a Medicamentos
RCMs	Resumos das Características do Medicamento
SMUH-ALTER	Sistema de gestão de Medicamentos de Uso Humano – Submissão Eletrónica de Pedidos de Alteração aos Termos de AIM
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>
XEVMPD	<i>Extended EudraVigilance Medicinal Product Dictionary</i>

## **I. Introdução**

Quatro anos após ter ingressado na Universidade de Coimbra, eis que surge a reta final do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) e, portanto, a oportunidade de colocar em prática todos os conhecimentos teóricos e competências que adquiri durante o meu percurso, através do estágio curricular.

Num considerável leque de saídas profissionais que o curso de MICF oferece e, sabendo que o Farmacêutico é o “especialista do medicamento e agente da saúde pública”, é muito gratificante a nossa instituição de ensino presentear-nos com a oportunidade de incidirmos o nosso estágio curricular numa área que não a Farmácia Comunitária ou a Farmácia Hospitalar, uma vez que nos facilita o acesso a outras vertentes, nas quais o Farmacêutico tem um papel de extrema relevância e que, do mesmo modo, participam no circuito do medicamento e, portanto, na saúde e bem-estar da população-alvo [1].

Tendo em conta já ter experienciado os ramos da Farmácia Clínica e Farmácia Hospitalar anteriormente e de possuir uma maior noção do funcionamento de Farmácia Comunitária em relação a outras áreas, era de minha grande vontade investir em novos desafios, de modo a adquirir novas capacidades, novos conhecimentos e passar por mais “saberes” do ciclo do medicamento. Afinal, apenas estando no “campo de batalha” é que se compreende verdadeiramente a tática e estratégia do mesmo e é onde poderemos realmente perceber se a nossa posição é a que melhor demonstra aquilo de que somos capazes.

Deste modo, aspirando em ter contacto com a área de Assuntos Regulamentares, surgiu a oportunidade de realizar um estágio na *Owlpharma – Consulting, Lda.*, uma empresa de consultoria com sede na Incubadora de Empresas do Instituto Pedro Nunes (IPN) em Coimbra, direcionada para o setor farmacêutico, a qual presta serviços concebidos para abranger o ciclo de vida de produtos de saúde, com especialização em Assuntos Regulamentares, Farmacovigilância e Garantia de Qualidade [2].

Em suma, o presente relatório destina-se a descrever e fundamentar todas as tarefas, atividades e competências alcançadas durante a realização deste mesmo estágio curricular, decorrido desde o dia 2 de janeiro de 2019 ao dia 31 de março de 2019, com a duração total de 3 meses, sob a orientação da Dra. Ana Andrade, bem como o impacto que o

mesmo teve na construção do meu percurso profissional, enquanto futura farmacêutica. Este apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), onde na mesma constam todas as reflexões acerca dos pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças relacionadas com o processo de estágio.

## **2. Owlpharma – Consulting, Lda.**

A *Owlpharma – Consulting Lda.* trata-se de uma empresa de consultoria especializada para o setor farmacêutico nas áreas de Farmacovigilância, Assuntos Regulamentares e Garantia de Qualidade que se encontra sediada no Instituto Pedro Nunes (IPN), uma incubadora de empresas, localizada em Coimbra, cujo objetivo é apoiar o crescimento de pequenas, novas empresas [2].

Esta empresa foi fundada no final do ano de 2013, e presta serviços especializados, em articulação com autoridades competentes a nível nacional e internacional, em conformidade com a legislação aplicável, relacionados com medicamentos de uso humano, dispositivos médicos, suplementos alimentares e cosméticos, ao longo do ciclo de vida destes produtos de saúde [2].

A *Owlpharma* tem crescido ao longo dos anos, encontrando-se em grande expansão, tendo ganho já alguns prémios que a distinguem como uma empresa inovadora e em crescimento, tendo em maio de 2019 sido distinguida como “*Empresa Gazela*” (As “*Empresas Gazela*” são empresas jovens que num curto período de tempo apresentam um crescimento acelerado ao nível do emprego e do volume de negócios) [3].

## **3. Análise SWOT**

### **3.1. Pontos Fortes**

#### **3.1.1. Integração na Equipa**

Um dos pontos mais fortes durante o meu estágio na *Owlpharma* foi sem dúvida o grupo de pessoas no qual me inseri e pela qual a mesma é constituída. O facto de ter sido integrada numa equipa jovem, dinâmica, versátil, exigente e, ao mesmo tempo, muito acolhedora, levou a que pudesse tirar o maior partido do estágio, não só a nível de aplicação de conhecimentos, como também ao nível de relações interpessoais.

Nos momentos de desempenhar tarefas, sempre senti apoio durante a realização das mesmas e sempre se colocaram à minha disposição para tirar quaisquer dúvidas que poderiam surgir. Ao mesmo tempo, havia incentivo interno para a equipa juntar-se nos momentos de lazer, tais como as refeições, discutindo assuntos do quotidiano/culturais, o que considero ser bastante importante para a união e reforço da equipa.

Por outro lado, o facto da mesma ser pequena levou a que me sentisse desde logo incluída, bem como estabelecesse uma ligação mais forte e mais descontraída com os diferentes departamentos, o que contribuiu para a minha rápida adaptação a esta nova fase do meu percurso académico.

### 3.1.2. Versatilidade de Tarefas/Funções

O facto da *Owlpharma* ser constituída por vários departamentos e desempenhar um papel bastante polivalente no que respeita ao ciclo do medicamento, levou a que eu tivesse a oportunidade de executar um leque variável de tarefas.

Ao nível dos Assuntos Regulamentares, tive a oportunidade de participar na conversão de pedidos de AIM em formato eCTD (*Electronic Common Technical Document*), bem como na sua gestão de alterações, através da plataforma do INFARMED, I.P., *SMUH-ALTER* (Sistema de gestão de Medicamentos de Uso Humano - Submissão Eletrónica de Pedidos de Alteração aos Termos de AIM); participar na preparação, revisão e tradução de Resumos das Características dos Medicamentos (RCMs), Folhetos Informativos (FIs) e Rotulagens de medicamentos, segundo o formato QRD (*Quality Review of Documents*) e com recurso a termos *MedDRA* (*Medical Dictionary for Regulatory Activities*); auxiliar na revisão de Relatórios de Perito/*Medical Writing*, na revisão e preparação de *Bridging Reports*, na introdução e manutenção de dados do produto via *XEVMPD* (*Extended EudraVigilance Medicinal Product Dictionary*), na elaboração de Avaliação de Risco Ambiental do Medicamento (ERA), e ainda, na realização de Testes de Legibilidade e pesquisa de suporte para alegações de produtos cosméticos.

Ao nível da Farmacovigilância pude colaborar em pesquisas na literatura nacional e internacional (ex.: *PubMed*<sup>®</sup>) de Reações Adversas a Medicamentos (RAM), através da análise, tradução e resumo de artigos de casos de RAM e ainda no auxílio da elaboração de Relatórios Periódicos de Segurança (*PSUR*).

A versatilidade de funções que desempenhei durante o meu período de estágio na *Owlpharma* foi sem dúvida muito gratificante e desafiante, uma vez que com a maioria das mesmas nunca tinha tido qualquer contacto prático, sendo portanto um dos pontos mais fortes.

### 3.1.3. Desenvolvimento de Competências/Soft-Skills

Com a versatilidade de funções que tive a oportunidade de desempenhar, desenvolvi competências e *soft-skills* que considero muito enriquecedoras como futura farmacêutica, nomeadamente, o trabalhar em equipa para um objetivo comum, o saber lidar com várias personalidades, a capacidade de comunicar e transmitir informação, o aprofundamento dos meus conhecimentos em ferramentas informáticas (ex.: *Microsoft Office*<sup>®</sup>, *Acrobat Reader DC*<sup>®</sup>, etc.), o desenvolvimento da língua inglesa, nomeadamente a leitura e escrita, e ainda, o contacto com outras línguas (ex.: língua sueca), que elevaram o patamar dos meus conhecimentos nas mesmas, uma vez que passavam por uma linguagem mais científica. Também o aperfeiçoamento dos métodos para pesquisa bibliográfica em plataformas como a *PubMed*<sup>®</sup> e revistas nacionais, levaram a que eu tivesse uma maior perceção na seleção de informação, já que, numa era em que o acesso à informação é praticamente dado como adquirido, o saber seleccioná-la e rateá-la é sim o maior desafio da atualidade.

### 3.1.4. Autonomia/Responsabilidade

Com os prazos definidos para término e submissão dos serviços solicitados pelos clientes da *Owlpharma* e com a quantidade dos mesmos que por vezes se sobrepunham aos já existentes, senti na pele a pressão de ter que cumprir os objetivos no período que me pediam para os concluir, o que para além de me dar mais confiança, também me fez adquirir mais autonomia com a responsabilidade incutida. Considero um ponto bastante forte para o meu futuro, pois entendo que é de grande valor um profissional ser considerado autónomo, capaz de tomar decisões e cumprir os objetivos definidos.

## 3.2. Pontos Fracos

### 3.2.1. Qualidade de Tarefas

Apesar da versatilidade de tarefas que tive a oportunidade de desempenhar, nem sempre as mesmas se mostravam as mais desafiantes. Grande parte do meu estágio realizei tarefas como paginação e conversão de *dossiers* de AIM de ficheiro *Document (DOC, Microsoft Word®)* para ficheiro *Portable Document Format (PDF)*, que apesar de saber que era um trabalho necessário para um fim concreto e maior, este não despertava ou me estimulava a colocar em prática os meus conhecimentos na área das Ciências Farmacêuticas.

### 3.2.2. Feedback

Inicialmente, em algumas das tarefas que executei, muitas das vezes não obtive *feedback* acerca das mesmas, o que me levou a questionar o resultado final dos meus trabalhos, principalmente no que dizia respeito às funções com que estava a contactar pela primeira vez. No entanto, com o aumento da confiança e com o passar do tempo, fui pedindo esse mesmo *feedback* quando o mesmo não me era facultado, uma vez que considero muito pertinente perceber aquilo em que podemos melhorar, não só para o aperfeiçoamento das minhas capacidades, mas também para que a qualidade do meu trabalho fosse de encontro às expectativas da empresa.

### 3.2.3. Abrangência a Departamentos Específicos

Durante o período que passei na *Owlpharma*, embora tenha tido a oportunidade de realizar um leque versátil de funções, estas passaram na sua maioria pelo departamento de Assuntos Regulamentares e uma minoria pelos departamentos de Farmacovigilância e Garantia de Qualidade, o que não me permitiu tirar o maior partido e conhecimento prático destas duas últimas áreas, tanto como gostaria. Para além disso, em alguns dos serviços que esta empresa oferece, nomeadamente no âmbito de *Marketing* e Publicidade de Medicamentos, tive muito pouco contacto, sendo que teria sido do meu interesse explorar e aprofundar os meus conhecimentos relativamente a este tema. No entanto, compreendo também que, sendo a *Owlpharma* uma empresa de consultoria farmacêutica, esta torna-se muito dependente dos pedidos por parte dos clientes e, portanto, o facto de não ter tido certas oportunidades poderia ser devido a este facto.



### 3.3. Oportunidades

#### 3.3.1. Conhecimento da Área de Consultoria Farmacêutica

Uma das oportunidades que a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e este estágio me proporcionaram foi sem dúvida conhecer a área de consultoria, no âmbito da indústria farmacêutica e poder contactar com o quotidiano de uma equipa empenhada em cumprir os objetivos dos seus clientes, nomeadamente no campo dos Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância. A área de consultoria farmacêutica é sem dúvida muito desafiante, onde aplicamos bastantes conhecimentos não só adquiridos durante o nosso percurso académico, mas também através das nossas atividades extracurriculares. Oferece-nos, ainda, a oportunidade de perceber minimamente alguns dos processos prévios e subsequentes ao lançamento de um medicamento/produto de saúde, necessários para a sua estabilidade e adaptação ao mercado farmacêutico.

#### 3.3.2. Formações Internas

A minha estadia na *Owlpharma* proporcionou-me ainda com a oportunidade de receber formações internas, nomeadamente nas áreas de Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância, recordando tópicos e adicionando novos conhecimentos aos já adquiridos no MICF. Uma das formações que mais me marcou foi sem dúvida a formação sobre os testes de legibilidade, uma vez que desconhecia e nunca tinha estado em contacto com este método de avaliação de FIs de medicamentos, que mais tarde, após aprovação dos mesmos, iriam ser lançados no mercado. Após esta formação acerca do funcionamento do processo e das suas particularidades, tive ainda a oportunidade de colocar a mesma em prática, participando como entrevistadora, nos testes de legibilidade do FI para o lançamento de um novo medicamento genérico, sendo que foi uma experiência muito enriquecedora e que se destacou no meu percurso na *Owlpharma* como sendo bastante desafiante.

### 3.4. Ameaças

#### 3.4.1. Compatibilidade com Estágio Curricular Obrigatório

O facto de termos a oportunidade de realizar um estágio curricular opcional constitui uma mais-valia no nosso percurso e futuro profissional, no entanto, a responsabilidade acrescida com a realização do mesmo juntamente com o estágio curricular obrigatório em

farmácia comunitária, torna difícil a conciliação e gestão do tempo que temos disponível para realizarmos os dois estágios e ainda a elaboração da monografia, juntamente com os relatórios dos dois estágios. Considero isto uma ameaça para quem pretende realizar mais que um estágio.

#### **4. Conclusão**

Em suma, o meu estágio em consultoria farmacêutica na *Owlpharma*, com a duração de 3 meses, apresentou-me uma experiência bastante enriquecedora e permitiu-me ter uma primeira perceção daquilo que são as áreas, principalmente, de Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância, numa vertente mais prática. Foi também uma oportunidade para aplicar os conhecimentos adquiridos durante o MICF e ainda alcançar competências que farão uma enorme diferença, não só no meu percurso profissional, mas também pessoal.

Finalmente, o facto de contactar com o ambiente empresarial apresentou-me uma compreensão mais abrangente da extensão do papel das Ciências Farmacêuticas. É realmente muito gratificante a profissão farmacêutica ser polivalente nas mais diversas áreas que abrangem o ciclo do medicamento e, portanto, termos um contributo e impacto na saúde e na educação para a mesma.

Agradeço desde já à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela oportunidade concedida em realizar um estágio opcional e ainda, a toda a excelente equipa da *Owlpharma* pelo seu contributo no meu percurso. Sem os mesmos, esta experiência não teria sido a mesma e tudo aquilo que aprendi e adquiri com este estágio devo-lhes grande parte.

## Referências Bibliográficas

1. Pita, J.R.B., Victoria, *A Farmácia em Portugal nos Últimos 30 Anos: algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária. Debater a Europa, 2016. I: p. 197-215.*
2. OWLPHARMA – CONSULTING. **[acedido a 19/08/2019]**. Disponível em: <https://www.owlpharma.pt/>
3. COMISSÃO DE COORDENAÇÃO E DESENVOLVIMENTO REGIONAL DO CENTRO (CCDRC) – *Empresas Gazela 2018. [acedido a 19/08/2019]*. Disponível em: [http://www.ccdrc.pt/index.php?option=com\\_docman&view=download&alias=4633-empresas-gazela-2018&category\\_slug=2019-1&Itemid=739](http://www.ccdrc.pt/index.php?option=com_docman&view=download&alias=4633-empresas-gazela-2018&category_slug=2019-1&Itemid=739)

---

# Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

## *Farmácia dos Olivais*

---

Relatório de Estágio referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Ana Maria Tadeu Brandão, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

1 2



9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

## **Lista de Abreviaturas e Acrónimos**

<i>COE</i>	Contraceção Oral de emergência
<i>DCI</i>	Denominação Comum Internacional
<i>FFUC</i>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<i>LPCC</i>	Liga Portuguesa Contra o Cancro
<i>MICF</i>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<i>MNSRM</i>	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
<i>MSRM</i>	Medicamento Sujeito a Receita Médica
<i>PIM</i>	Preparação Individualizada da Medicação
<i>PUV</i>	Preparações de Uso Veterinário
<i>SNS</i>	Serviço Nacional de Saúde
<i>SWOT</i>	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threads</i>

## **1. Introdução**

O Farmacêutico Comunitário ou de Oficina é considerado como tendo a área de atuação mais representativa da atividade farmacêutica, não só pela visibilidade e importância que detém junto do público, mas também pela quantidade de profissionais que absorve [1].

Apesar do farmacêutico ser o “especialista do medicamento e agente da saúde pública”, a verdade é que o objetivo principal do ato farmacêutico é a pessoa do doente e o medicamento é apenas o vetor principal desse mesmo ato, tendo portanto, a fração “agente de saúde pública, cada vez mais realce nos dias que correm e as funções do farmacêutico estão muito mais para além do medicamento [1]. Este papel é algo que se tem vindo a destacar, sendo cada vez mais inerente ao farmacêutico, através do aconselhamento e das suas ações de intervenção, promoção e educação para a saúde, e com o qual a profissão farmacêutica tem ganho consolidação e reconhecimento social, ao contrário do que antigamente acontecia [1].

Assim sendo, tendo como primícias estas constatações, foi com grande entusiasmo que tive a oportunidade de aplicar os conhecimentos e competências adquiridos durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), no estágio curricular obrigatório em Farmácia Comunitária.

O presente relatório visa assim descrever todas as atividades e funções que desempenhei ao longo do meu estágio na *Farmácia dos Olivais*, com a duração de 810h, tendo iniciado o mesmo no dia 3 de abril de 2019 e concluído no dia 23 de julho de 2019, sob orientação da Dra. Ana Maria Tadeu Brandão. Este apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), onde na mesma constam todas as reflexões acerca dos pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças relacionadas com o processo de estágio.

## **2. Farmácia dos Olivais**

A *Farmácia dos Olivais*, situada na Rua Bernardo de Albuquerque nº141, na freguesia de Santo António dos Olivais, em Coimbra, tem como proprietária Cristina Almiro e Castro – Farmácia Unip. Lda., estando a direção técnica assegurada pela Dra. Ana Filipa Gomes

Ferreira Agria. É sócia da Associação Nacional das Farmácias (ANF) e ainda membro de um grupo de compras, o Grupo Mais Farmácia.

O período de funcionamento da *Farmácia dos Olivais* decorre de segunda-feira a domingo, das 8h30 às 24h, excluindo domingos e feriados em que está aberta das 10h30 às 24h, tendo por isso, um horário bastante privilegiado e competitivo, em comparação com outras farmácias. Possui uma forte afluência e bastantes utentes fidelizados, não só graças ao seu excelente acompanhamento e aconselhamento, mas também pela sua localização e disponibilidade de horário.

A equipa da *farmácia dos Olivais* é constituída por 7 farmacêuticos Dra. Ana Agria, Dra. Ana Brandão, Dra. Anabela Rocha, Dra. Daniela Monteiro, Dr. Diogo Dias, Dra. Inês Gonçalves e Dra. Rita Mendes; uma técnica de farmácia, a Dra. Andreia Figueiredo, e uma técnica de limpeza, Sr.<sup>a</sup> Fátima Frias. Esta é uma equipa de excelência cujo máximo propósito centra-se na satisfação dos seus utentes e suas necessidades, bem como na manutenção do bom funcionamento da Farmácia.

### **3. Análise SWOT**

#### **3.1. Pontos Fortes**

##### **3.1.1. Equipa da Farmácia dos Olivais**

Um dos pontos mais fortes do meu estágio na *Farmácia dos Olivais* foi ter tido o privilégio de trabalhar com uma equipa excelente, muito dedicada no aconselhamento e na educação para a saúde dos seus utentes e que me recebeu como se fosse um membro da equipa. Agora que tive o contacto com uma vertente mais prática da farmácia comunitária, penso ser fundamental esta integração, uma vez que considero que estar num ambiente de trabalho onde nos sintamos bem é realmente pertinente para sermos melhores profissionais. Para além disso, sempre que tive alguma dúvida ou até mesmo quando não tinha tantos conhecimentos em determinado assunto, a equipa da *Farmácia dos Olivais* esteve sempre presente para me auxiliar no que fosse necessário e, portanto, pude aprender imenso com a mesma e usufruir ao máximo de todo o meu período de estágio.

### 3.1.2. Planeamento do Estágio no Desenvolvimento de Competências e Capacidades

O planeamento do meu estágio na *Farmácia dos Olivais* foi sem dúvida muito bem executado, uma vez que consistiu numa aprendizagem gradual de todas as dimensões que constituem o ramo da Farmácia Comunitária. Iniciei o meu estágio principalmente no *BackOffice*, de modo que pude contactar com tudo aquilo que acontece para o medicamento ou produto de saúde poder ser entregue ao utente com a maior segurança e qualidade possível. E concluí deste modo, no atendimento ao público, onde pude ter a realidade do cerne de um farmacêutico comunitário. Assim sendo, tive a oportunidade de desenvolver competências e capacidades que considero fundamentais como futura profissional de saúde.

Ao nível da comunicação e transmissão de informação, através do aconselhamento no atendimento ao público e atendimento telefónico, aprendi a importância da adaptação da linguagem ao utente, uma vez que, consoante a pessoa com que estamos a lidar (ex.: criança, idoso), temos que nos ajustar à mesma para haver uma maior compreensão entre ambas as partes. Também ao nível do atendimento, o desenvolvimento da empatia com o utente foi um dos pontos que me marcou, sendo que a preocupação pelo bem-estar dos mesmos, quer fossem habituais ou não da farmácia, foi crescendo ao longo do tempo. A capacidade para aconselhar e aplicar os meus conhecimentos adquiridos durante o MIFC foi um dos maiores desafios. No entanto, graças à excelente equipa da *Farmácia dos Olivais* foi-se tornando cada vez mais fácil e é sem dúvida muito satisfatório quando realmente fazemos a diferença, quer na adesão à terapêutica, quer na educação para a saúde, não só ao nível dos medicamentos, mas também ao nível dos cosméticos, suplementos alimentares e dispositivos médicos. Para além de ter aprofundado o meu contacto com o programa *SIFARMA 2000*<sup>®</sup>, também compreendi a importância de certos pormenores no atendimento, nomeadamente o dirigir-se ao utente sempre pelo seu nome adicionado à questão que se quer fazer, o manter o contacto visual e o ter confiança na transmissão da informação, entre outras particularidades.

Ao nível do *BackOffice* da *Farmácia dos Olivais*, pude ter uma primeira impressão de como funciona a gestão e organização de uma farmácia e de processos burocráticos que a incluem. Tive a oportunidade de fazer receção e arrumação de encomendas, transferências entre farmácias, devolução de medicamentos, verificação e controlo dos prazos de validade e *stocks*, revisão e organização de receitas manuais e, ainda, pude conhecer com maior profundidade todos os produtos de saúde com os quais muitas vezes não tinha contactado



anteriormente e a importância do seu armazenamento. A associação entre a designação comercial e por DCI, a distinção entre Medicamento Sujeito a Receita Médica (MSRM) e Medicamento Não Sujeito a Receita Médica (MNSRM), as diferentes dosagens existentes e ainda, as diferentes formas de administração dos mesmos, foi também uma preocupação que tive e que também me foi inculcada pela equipa da *Farmácia dos Olivais*, para tirar o maior benefício para os meus conhecimentos e conseqüentemente, aumentando a qualidade do atendimento.

Ainda ao nível do *Marketing* e Publicidade pude participar em estruturação de montras e organização e gestão do espaço da farmácia, mostrando-me também a importância do “chamar a atenção” e na educação para a saúde, dos utentes que frequentavam a mesma.

Por último, percebi a importância do papel do farmacêutico na adesão à terapêutica, que penso ser um dos pontos mais fortes que me foi inculcado no estágio e que fui desenvolvendo ao longo do meu atendimento. O simples facto de explicarmos detalhadamente como funciona a aplicação de certos medicamentos, nomeadamente colírios, inaladores, transdérmicos, injetáveis, pode realmente fazer a diferença, uma vez que uma grande parte de certos tratamentos não terem a eficácia esperada, se deve ao facto de muitas vezes os doentes não aderirem à medicação, por não saberem como se administram ou simplesmente por desconhecerem os seus benefícios.

### 3.1.3. Horário Privilegiado

O facto da *Farmácia dos Olivais* ter um horário bastante alargado trouxe bastantes benefícios, já que pude experienciar tanto o período diurno como o período noturno, permitindo-me assistir e participar numa diversidade de atendimentos com situações bastante versáteis, bem como perceber a mudança do espaço para atendimento ao público, já que no período noturno o atendimento era feito através do postigo e não ao balcão, como no período diurno. Assim, o facto da maior parte da população trabalhar durante o período diurno, fazia com que muitas vezes o período noturno ficasse mais sobrecarregado e, portanto, a variedade de casos era por vezes maior, permitindo-me tirar bastantes conhecimentos em ambos os períodos.

#### 3.1.4. Serviços Farmacêuticos, Apoio a Causas e Colaboração com Projetos

Tendo a *Farmácia dos Olivais* uma grande variedade de Serviços Farmacêuticos que disponibiliza aos seus utentes, foi-me possível contactar com alguns, nomeadamente medição de parâmetros bioquímicos, observação de administração de injetáveis e de uma Preparação Individualizada da Medicação (PIM).

Ao nível do apoio a causas, a *Farmácia dos Olivais* prima pela solidariedade, uma vez que apresenta várias parcerias nomeadamente com a *Liga Portuguesa Contra o Cancro (LPCC)*, o *Programa abem:* e ainda com vários lares, pelo que foi bastante pertinente saber que o farmacêutico está ligado às boas causas na sua profissão.

E ainda, pude contactar com os vários projetos possíveis de colaboração com a farmácia comunitária, nomeadamente, o projeto *VALORMED®* e o *Programa Troca de Seringas* e a sua importância para a população-alvo.

### 3.2. Pontos Fracos

#### 3.2.1. Preparação de Manipulados

A preparação de manipulados constituiu sem dúvida um dos pontos fracos da minha passagem pela vertente prática da farmácia comunitária. Apesar da *Farmácia dos Olivais* possuir este serviço para a população, com um laboratório equipado e preparado para tal, não tive a oportunidade de observar ou participar no mesmo, no entanto, tal se deveu a não ter surgido nenhum pedido por parte de um utente, durante o período de tempo que estive presente. Sendo a preparação de manipulados um serviço bastante inerente ao farmacêutico comunitário, considero que é fundamental aplicar os conhecimentos galénicos e tecnológicos adquiridos durante o MICF numa vertente mais prática e, para isso, o estágio pode ser o início para este contacto.

#### 3.2.2. Autonomia no Atendimento

Apesar da equipa da *Farmácia dos Olivais* ser muito prestável e garantir sempre a supervisão nas tarefas que desempenhei, tirando-me sempre todas as dúvidas e questões que poderiam surgir, nem sempre considerei esta presença a mais proveitosa, no sentido de ganhar mais autonomia, particularmente ao nível do atendimento. Uma vez que apenas

comecei a participar no mesmo nas últimas 3 semanas do meu período de estágio, tenho noção que ainda não possuía a experiência necessária para desempenhar a melhor qualidade de atendimento e, portanto, a supervisão de um farmacêutico era necessária, no entanto, isto não me permitiu adquirir a autonomia que esperava obter com o término do estágio. Considero que por vezes é necessário errarmos para podermos aprender com esses mesmos erros e termos assim, a oportunidade de melhorar. Deste modo, a minha confiança para atender sem supervisão não chegou ao nível que gostaria de ter alcançado.

### 3.3. Oportunidades

#### 3.3.1. Ações de Educação e Promoção para a Saúde

Uma das grandes oportunidades do meu estágio na *Farmácia dos Olivais* foi sem dúvida participar em duas grandes ações de educação e promoção para a saúde, nomeadamente, “A 2ª Caminhada dos Olivais”, que decorreu na Mata do Choupal e ainda, a “Formação sobre Proteção Solar” aos estudantes da Escola Básica I dos Olivais, de 2º e 4º anos. A primeira realizou-se com o objetivo de promover a atividade física e o contacto com a natureza, entre a população de Coimbra. Foi realmente uma experiência muito enriquecedora, com a duração de 4h, em que pude participar não só presencialmente, como também na sua organização e preparação. A segunda, teve como objetivo a educação dos mais jovens para a importância da proteção solar. Uma vez que se avizinhavam os tempos em que há uma maior predisposição a queimaduras por parte dos raios solares, nunca é demais relembrar a sua forma de prevenção, através de uma formação onde se discutiram as mais variadas formas, juntamente com o protetor solar, para evitar essas mesmas consequências.

Considero que estas ações são realmente muito relevantes para a educação da população e para a prevenção de futuros perigos para a sua saúde, mostrando que o farmacêutico tem realmente um papel muito importante como agente da saúde pública.

#### 3.3.2. Formações Internas

As farmácias comunitárias têm acesso a formações para os seus farmacêuticos internos nas mais variadas áreas de atuação, organizadas por laboratórios. Com o meu estágio, tive a oportunidade de participar em diversas formações, subordinadas, nomeadamente, aos temas de aplicação de colírios e pomadas oftálmicas, olho seco e

alergias oculares, proteção solar, suplementos alimentares, doenças gastrointestinais, ortopedia, entre outros temas que enriqueceram os meus conhecimentos nestas áreas e sem dúvida que debateram tópicos importantes para acrescentarmos ao nosso aconselhamento para com o utente.

Para além dessas formações, também pude assistir a outras presencialmente na *Farmácia dos Olivais*, sobretudo ao nível dos cosméticos, organizadas pelos delegados comerciais pertencentes aos laboratórios dos mesmos. Também me foram dirigidos bastantes casos clínicos por parte da equipa interna, estimulando a minha capacidade de atendimento simulado, raciocínio e onde aplicava conhecimentos que por vezes não tinha oportunidade de aplicar durante os atendimentos. Tudo isto acrescentou mais valor e autonomia nas áreas de Indicação e Intervenção Farmacêutica.

### 3.4. Ameaças

#### 3.4.1. Dispositivos Médicos e Produtos de Uso Veterinário

O plano de estudos do MIFC na FFUC, apesar de muito abrangente e muito completo, não inclui os dispositivos médicos como uma unidade curricular obrigatória e na minha opinião esta situação acaba por se revelar uma ameaça para a vertente prática de farmácia comunitária, uma vez que no quotidiano somos confrontados com inúmeros casos de doentes que necessitam de dispositivos médicos e com os quais eu considero não ter conhecimento e preparação suficientes para um atendimento com qualidade, nomeadamente ao nível dos produtos ortopédicos. O mesmo se observa com os produtos de uso veterinário. Apesar de no nosso plano de estudos possuímos a unidade curricular obrigatória “Preparações de Uso Veterinário (PUV)”, considero que esta mesma necessita de ser reformulada para uma vertente de melhor conhecimento daquilo que os utentes procuram para os cuidados com os seus animais, de modo a estarmos preparados para responder às necessidades dos mesmos.

#### 3.4.2. Organismos e Entidades de Participação

Para além do Serviço Nacional de Saúde (SNS), existem vários organismos que participam os MSRM e diversos dispositivos médicos. Para haver essa participação, é necessário na maior parte dos casos, haver a colocação manual dessas entidades, no ato da

dispensa da prescrição médica, através do SIFARMA 2000<sup>®</sup>, de forma a o utente ter uma maior participação no preço dos seus medicamentos. No entanto, previamente ao estágio, nunca tinha contactado com os inúmeros organismos e entidades que existem para esse fim. Deste modo, isto constituiu uma ameaça para o mesmo, uma vez que, após ter tido o contacto com esta realidade, devido à grande quantidade de entidades existentes, muitas vezes tinha bastantes dificuldades em seleccionar o organismo de participação correto e específico do utente. Talvez incluir esta questão numa unidade curricular do nosso plano de estudos fosse uma mais-valia para o nosso percurso em farmácia comunitária e também a nível pessoal, de modo a não cometermos erros neste tipo de situações.

#### **4. Conclusão**

Em suma, o meu estágio em farmácia comunitária, na *Farmácia dos Olivais*, revelou-se uma experiência única e muito enriquecedora, na medida em que pude tirar o maior partido da mesma. Obtive e aprofundei conhecimentos e capacidades que levo como futura profissional de saúde e para a vida pessoal, bem como, um maior sentido de responsabilidade e autonomia no relacionamento com as pessoas. Sem dúvida que o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, dá-nos os alicerces necessários para exercermos a nossa profissão em farmácia comunitária e assim, com a experiência e prática, vamo-nos tornando capacitados para responder às necessidades da saúde da nossa população.

Termino com um agradecimento muito especial a toda a equipa da *Farmácia dos Olivais*, que me apoiou e incentivou nas minhas conquistas, durante o meu estágio na mesma.

## Referências Bibliográficas

1. Pita, J.R.B., Victoria, A *Farmácia em Portugal nos Últimos 30 Anos: algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária. Debater a Europa, 2016. I: p. 197-215.*
2. INFARMED, I.P. - *Resumo das Características do Medicamento: NiQuitin<sup>®</sup> Menta Fresca 4 mg, Goma para Mascar Medicamentosa.* [acedido a 20/08/2019]. Disponível em: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=583842&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=583842&tipo_doc=rcm)
3. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE (DGS) - *Cessação Tabágica, Normas da DGS.* [acedido a 20/08/2019]. Disponível em: <http://nocs.pt/wp-content/uploads/2016/04/livro-dgs-cessao-tabgica.pdf>
4. INFARMED, I.P. - *Resumo das Características do Medicamento: Postinor<sup>®</sup> 1500 microgramas Comprimido.* [acedido a 20/08/2019]. Disponível em: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=39678&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=39678&tipo_doc=rcm)
5. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE (DGS), SAÚDE REPRODUTIVA - *Contraceção de Emergência (CE).* [acedido a 20/08/2019]. Disponível em: <https://www.saudereprodutiva.dgs.pt/publicacoes/planeamento-familiar--contracepcao/contracepcao-de-emergencia-pdf.aspx>

## ANEXOS

### Casos Clínicos

#### Caso I – Substitutos de Nicotina para Cessação Tabágica

Um senhor com cerca de 50 anos dirigiu-se à *Farmácia dos Olivais*, com o intuito de medir a sua pressão arterial. Após ter verificado a mesma, notei que esta se encontrava ligeiramente aumentada (135/80 mmHg) e referi para tentar ter sempre algum cuidado com a quantidade de sal que ingeria. Neste propósito, o senhor acabou por me interromper e referir que, a razão pela qual quis proceder à medição da pressão arterial foi pelo facto de nos últimos dias ter sentido algumas palpitações e sentir-se bastante nervoso. Após esta referência, questionei-o se tomava algum medicamento ou suplemento alimentar e este referiu que iniciou a toma de gomas medicamentosas de substituição de nicotina (NiQuitin®) há 1 semana, com o objetivo de cessação tabágica. Suspeitando que tais efeitos poderiam advir daí, questionei-o acerca da quantidade de gomas que ingeria por dia, da dosagem que se encontrava a tomar e quantos cigarros costumava fumar antes do início da terapêutica. O mesmo referiu que fumava entre 20 a 30 cigarros por dia, que se encontrava a tomar a dose de 4 mg e que chegava a mascar cerca de 20 gomas/dia. A NiQuitin® recomenda esta dosagem para quem fuma mais de 20 cigarros/dia, mas apenas recomenda mascar no máximo até 15 gomas diárias [2]. Alertei-o para o facto de estar a tomar 5 gomas diárias em excesso e que esse excesso poderia ser a causa das suas palpitações e nervosismo, pelo que recomendei a tomar apenas as 15 gomas/dia tal como recomendado pelo laboratório. Para além disso, aconselhei ainda a vigia regular da sua pressão arterial e frequência cardíaca, de modo a evitar futuros problemas e a assegurar que havia uma melhoria dos seus sintomas, bem como congratulei-o pela sua iniciativa em proceder à cessação tabágica, já que os malefícios do tabagismo para o nosso organismo são imensos [3].

#### Caso II – Pílula do Dia Seguinte

Um jovem dirigiu-se à *Farmácia dos Olivais* pedindo a pílula do dia seguinte. Nisto pergunto há quanto tempo tinha ocorrido a relação de risco e este respondeu-me que tinha acontecido há 1 dia atrás. Pergunto ainda se a senhora tomava algum contraceptivo oral, se possuía problemas de coagulação ou outro problema de saúde e se tomava algum tipo de medicação. Este respondeu-me negativamente também. Nisto recorri à Contraceção Oral

de Emergência (COE), com o objetivo de evitar uma gravidez indesejada, e dispensei ao utente Postinor<sup>®</sup>. No ato da dispensa referi a importância de tomar o mais rapidamente possível o comprimido de toma única de 1,5 mg de Levonorgestrel, uma vez que a eficácia é maior quanto mais próximo da relação desprotegida tiver sido tomado [4]. Para além disso, referi que sentir sintomas como náuseas, dores abdominais, diarreia, dores de cabeça ou haver um atraso na menstruação seguinte, poderiam acontecer. Referi ainda que caso a senhora vomitasse nas 3h seguintes à toma do medicamento, esta deveria repetir a toma do mesmo e que até à menstruação seguinte era recomendado utilizar um método contraceutivo de barreira [5].



---

# COMET ASSAY FOR NANOTOXICOLOGY ASSESSMENT

## *Nanoparticles Genotoxicity Testing*

---

Monografia intitulada de “*Comet Assay for Nanotoxicology Assessment – Nanoparticles Genotoxicity Testing*”, referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Professora Doutora Eliana Maria Barbosa Souto, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

## Resumo

Nanopartículas - Um conceito emergente que se tem estendido amplamente pelo mundo, com inúmeras aplicações no campo biomédico, desde intervenções terapêuticas a diagnósticas. Contudo, quão perigosas estas “partículas do tamanho de vírus” poderão ser? Esta é uma questão que a Nanotoxicologia visa responder, particularmente pelo facto de que, devido ao tamanho extremamente pequeno das nanopartículas e pela sua reatividade aumentada, em comparação com as respetivas matérias-primas, estas partículas têm uma probabilidade acrescida de serem internalizadas pelas células e de interagirem com o material genético, com a possibilidade de induzirem danos no ADN.

O Ensaio do Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula-Única (SCGE), destaca-se pela sua capacidade em detetar quebras nas cadeias de ADN, em células eucarióticas. Deste modo, este ensaio apresenta um grande potencial na avaliação das interações das nanopartículas com as células, no que diz respeito à genotoxicidade. Assim sendo, aqui apresentamos uma visão geral das características e etapas envolvidas no Ensaio do Cometa, assim como uma revisão e compilação de algumas das nanopartículas que estão mais propensas ao contacto com os sistemas biológicos e que, adicionalmente, possuem o potencial de induzir, direta ou indiretamente, genotoxicidade (ex.: nanopartículas metálicas), através de diversas vias de administração (nanoformulações orais, tópicas, inalatórias, oculares e parenterais).

Na era do *boom* das nanopartículas, onde as *guidelines* para a sua avaliação ainda são bastante limitadas, é urgente garantir a sua segurança, juntamente com a sua qualidade e eficácia. Para alcançar esse objetivo, acreditamos que o Ensaio do Cometa poderá ser uma ferramenta essencial e uma fonte confiável para se alcançar uma melhor avaliação nanotoxicológica.

**Palavras-chave:** Nanopartículas, Ensaio Cometa, Danos no ADN, Genotoxicidade, Nanotoxicologia.

## **Abstract**

Nanoparticles - An emerging concept widely used worldwide, with several applications in the biomedical field, from therapeutics to diagnostics. However, how much hazardous these “virus-sized particles” can be? This is a question that Nanotoxicology aims to answer, particularly when it comes to the fact that, due to the extremely small size of nanoparticles and enhanced reactivity compared to the respective bulk materials, these particles have a high probability of being internalized by cells and interact with the genetic material, with the possibility of inducing DNA damage.

The Comet Assay, or Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE), stands out for its capacity of detecting DNA strand breaks in eukaryotic cells. Therefore, it has a huge potential in genotoxicity assessment of nanoparticles and respective cells' interactions. Here we present an overview of the characteristics and steps involved in the Comet Assay, as well as a review and compilation of some of the nanoparticles that are mostly in contact with biological systems, and additionally have the potential of, direct or indirectly, inducing genotoxicity (e.g. metal nanoparticles), through several routes of administration (oral, skin, inhaled, ocular and parenteral nanoformulations).

In a nanoparticles boom era, where guidelines for their evaluation are still very limited, it is urgent to guaranty their safety, along with their quality and efficacy. In order to do so, we believe that Comet Assay may be an essential tool and a reliable source for achieving a better nanotoxicology assessment.

**Keywords:** Nanoparticles, Comet Assay, DNA damage, Genotoxicity, Nanotoxicology.

## List of Abbreviations and Acronyms

<i>AgNPs</i>	Silver Nanoparticles
<i>ALSs</i>	Alkali Labile Sites
<i>AP</i>	Apurinic/Apyrimidinic
<i>AuNPs</i>	Gold Nanoparticles
<i>BAL</i>	Broncho-Alveolar Lavage
<i>CB NPs</i>	Carbon Black Nanoparticles
<i>CBMN</i>	Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome
<i>Cd</i>	Cadmium
<i>cDNA</i>	Complementary Deoxyribonucleic Acid
<i>CdSe</i>	Cadmium Selenide
<i>CeO<sub>2</sub> NPs</i>	Cerium Oxide Nanoparticles
<i>cSLN</i>	Cationic Solid Lipid Nanoparticles
<i>DAPI</i>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<i>DMSO</i>	Dimethyl Sulfoxide
<i>DNA</i>	Deoxyribonucleic Acid
<i>DSBs</i>	Double-Strand Breaks
<i>EDTA</i>	Ethylenediaminetetraacetic Acid
<i>EFSA</i>	European Food Safety Authority
<i>EMA</i>	European Medicines Agency
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
<i>FISH</i>	Fluorescence <i>in Situ</i> Hybridization
<i>FPG</i>	Formamidopyrimidine DNA Glycosylase
<i>GN-MA-NP</i>	Gantrez <sup>®</sup> AN 119 covered with Mannosamine Nanoparticles

<i>GN-NP</i>	Gantrez <sup>®</sup> Anhydride I 19 Nanoparticles
<i>HEK</i>	Human Epidermal Keratinocyte
<i>HUVEC</i>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
<i>IARC</i>	International Agency for Research on Cancer
<i>ICH</i>	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
<i>IONPs</i>	Iron Oxide Nanoparticles
<i>LMP</i>	Low Melting-Point
<i>MgO MPs</i>	Magnesium Oxide Microparticles
<i>MgO NPs</i>	Magnesium Oxide Nanoparticles
<i>MPs</i>	Microparticles
<i>NPs</i>	Nanoparticles
<i>OECD</i>	Organization for Economic Co-Operation and Development
<i>OECD WPMN</i>	Organization for Economic Co-Operation and Development - Working Party on Manufactured Nanomaterials
<i>PBL</i>	Peripheral Blood Lymphocytes
<i>PBS</i>	Phosphate-Buffered Saline
<i>PdI</i>	Polydispersity Index
<i>PEG</i>	Polyethylene Glycol
<i>PMK</i>	Primary Mouse Keratinocytes
<i>PVP</i>	Polyvinylpyrrolidone
<i>QDs</i>	Quantum Dots
<i>REACH</i>	Registration, Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals program of the European Commission
<i>ROS</i>	Reactive Oxygen Species

SAECs	Small Airway Epithelial Cells
SBs	Strand-Breaks
SCGE	Single-Cell Gel Electrophoresis
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SSBs	Single-Strand Breaks
TiO <sub>2</sub> NPs	Titanium Dioxide Nanoparticles
TSA	Total Surface Area
UV	<i>Ultraviolet</i>
UVB	Ultraviolet B
ZnO NPs	Zinc Oxide Nanoparticles
ZnS	Zinc Sulfide
ZP	Zeta Potential

## **I. Introduction**

Nowadays we live in an era where nanoparticles (NPs) are playing a major role in the development of new drugs, also known as “smart drugs”, as they can deliver a substance to the desirable target with higher efficiency and precision than conventional drug formulations, avoiding possible undesirable effects [1]. Additionally, other attributes such as the potential use as theranostic agents, have also been described [1].

However, a new concern has been raised as a consequence of the growing production and application of nanoparticles: “Nanotoxicology”. Nanoparticles are effective on their purposes, but how much they can be dangerous? “Small” also means that nanoparticles can reach places that other larger particles cannot, like, for example, the cellular core, where deoxyribonucleic acid (DNA) is, which implies that they may possibly interact with genetic material [2].

Although the use of nanoparticles can be applied for DNA damage, in order to cause cell death and eliminate neoplastic cells, miss-repaired damage or the occurrence of other nanoparticles interactions with the genetic material can possibly alter the cells’ functions and interfere with the synthesis of proteins, which may cause potential diseases or even lead to carcinogenicity [3] [4].

Genetic material related toxicity is known as “genotoxicity” and the potential of nanoparticles to induce genotoxicity can be considered primary (direct or indirect) or secondary. It is direct if the nanoparticles exhibit the capacity to reach the nucleus and provoke lesions directly in the genetic material. Indirect damage happens due to their capacity to induce oxidative stress which can cause genotoxicity. Secondary damage occurs due to the capacity of macrophages and/or neutrophils to cause an inflammatory response, which is based essentially on the release of inflammatory cytokines, causing lesions in genetic material too [5].

Despite the growing of investigation involving this topic, studies are still very limited and possible hazardous effects associated with nanotechnology systems are still unknown [6]. Therefore, it is urgent to investigate further their safety, especially because these “virus-sized particles” are in a continuous contact with humans on a daily basis, being present in food, cosmetics and also deriving from certain combustion processes, dispersing easily through biological systems as inhaled nanoparticles [7].

While official guidelines for evaluating the safety of nanoparticles are still somehow limited, regulatory authorities have been making an effort to implement recommendations on nanotoxicology assessment [8]. Genotoxicity tests are an extremely important portion of this assessment due to all the mentioned above reasons. Among the available tests, the Comet Assay is being extensively performed as a laboratory measure of genotoxicity, both *in vitro* and *in vivo* [9], being already considered as a powerful and promising tool for assessing DNA damage in human biomonitoring and in clinical studies, as well as a standard tool in the pharmaceutical industry for the evaluation of the safety of potential new drugs [10] [11].

This assay was not specifically designed for nanoparticles [12], but it is mentioned by several authors to explore their genotoxicity assessment. Numerous organizations recommend the comet assay: in 2014, Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) created a guideline (OECD test guideline 489) for the “*In vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay”, which describes the method in detail, as well its limitations and considerations, historical control data and other information to consider [13]. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) also suggests its use, among other assays, for further *in vivo* testing [14]. Additionally, it is accepted by the European Food Safety Authority (EFSA) and recommended as an appropriate test under the Registration, Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals program of the European Commission (REACH) [12] [14].

The role of the *in vitro* comet assay in regulatory toxicity is currently not defined but efforts are being made to validate it and due to its versatility, robustness and reliability, it has a great potential to be included in a test battery for genotoxicity assessment [12].

## **2. The Comet Assay: An Overview**

The comet assay, also known as Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE), is a simple and highly sensitive method for measuring DNA strand breaks, at the level of individual eukaryotic cells [15]. It is most commonly applied to animal cells, whether in culture or isolated from the organism, however, methods have also been developed to examine damage in the DNA of plant cells [16].

This procedure, developed by Östling and Johanson (1984) and then modified and optimized by Singh et al. (1988) [17], has become one of the standard methods, not only for



assessing DNA damage, with applications in genotoxicity testing, human biomonitoring, molecular epidemiology and ecotoxicology [15] [18], but also to evaluate the DNA repair capacity of cells [12] [19], since this activity can be monitored by incubating cells after treatment with damaging agent and measuring the decrease in damage remaining at intervals [3] [15].

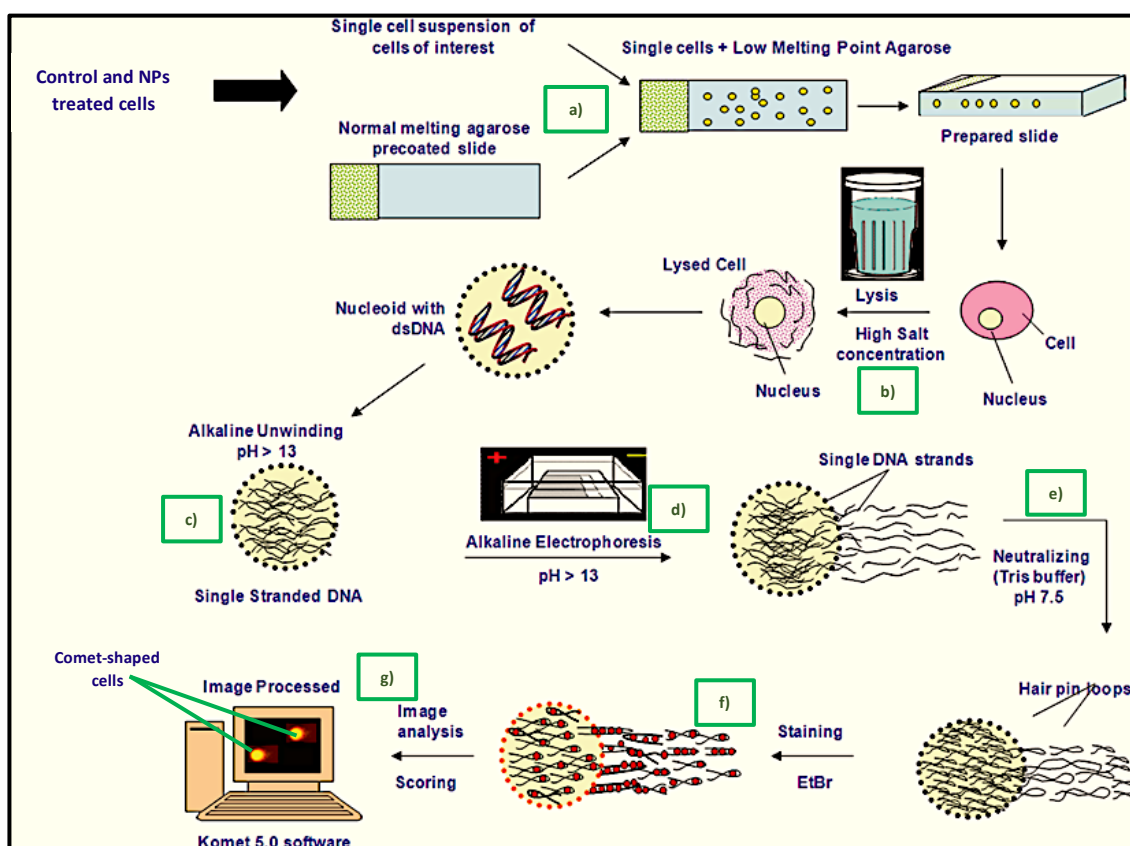
Depending on the literature and according to the purpose of this procedure, there are several ways of performing it, but the method most commonly used is the alkaline comet assay (Singh et al. procedure), for being the most sensitive in terms of detecting strand breaks of DNA, compared to the neutral one (Östling and Johanson procedure) [10]. Essentially, the alkaline process ( $\text{pH} > 13$ ) detects not only single and double-strand breaks (SSBs and DSBs) and even alkali labile sites (ALSs), but also specific base lesions, if combined with specific endonucleases [10], while neutral SCGE only detects DSBs. Beyond the sensitivity of this assay for detecting low levels of DNA damage [17], the alkaline comet assay has several other advantages such as: requirement for small numbers of cells per sample, flexibility, low costs, ease application and short time needed to complete the experiment [20]. Additionally, this assay permits to measure damage at any phase of the cell cycle, as it considers both DNA content and DNA damage [13].

The alkaline Comet Assay is based on the fact that cells embedded in agarose gels on microscope slides are lysed in the presence of high salts concentration and detergents, to generate “nucleoids”. These bodies consist of loops of negatively supercoiled DNA anchored to a residual proteinaceous nuclear matrix network. The agarose-embedded nucleoids are then subjected to high pH, to allow DNA to unwind and then it is performed a subsequent brief alkaline electrophoresis [10]. Upon electrophoresis, nucleoid DNA is attracted to the anode, but only those loops containing a break, which relaxes the supercoiling, are free to unwind and migrate in the direction of electrophoresis to form comet-like shapes, giving the name to the assay [15] [21]. The comet “head” contains undamaged DNA unlike the comet “tail” that contains damaged/relaxed DNA, which can be observed, usually, through fluorescence microscopy. Several authors argue that the degree of intensity of the comet “tail” is proportional to the number of DNA strand breaks present in that individual cell [15] [22].

Therefore, the alkaline comet assay is mainly based on seven steps:

a) Microscope Slides Preparation

- b) Lysis of Cells
- c) Exposure to Alkali (pH > 13)
- d) Electrophoresis (pH > 13)
- e) Neutralization of Alkali
- f) DNA Staining and Comet Visualization
- g) Comet Scoring



**Figure 1** - Schematic Showing of the Comet Assay Main Steps. (Adapted from: [23])

### a) Microscope Slides Preparation

The procedure begins with the preparation of the microscope slides, with the suspension of cells we want to analyze, previously prepared. This step is performed in order to obtain uniform gels sufficiently stable to survive through to analysis of the results, as well as to ensure easily visualized comets with the minimal background noise [17] [20]. There are several techniques for the slide preparation, but they all involve embedding cells in agarose layers. Each slide can be prepared with one to three layers of one or two independent agarose gels [20].

The single-layer procedure consists in suspending cells in low melting-point (LMP) agarose (generally 37°C) and then place them directly on a slide [17] [20]. In the two-layer procedure, the slide is precoated with a layer of regular agarose (we can find these precoated slides commercially) and then, an agarose layer containing the cells is placed on that precoated slide [20]. This first-layer coat of agarose, on the slide, improves the attachment of subsequent agarose layers [24]. In the three-layer procedure, the process is very similar to the two-layer, but the difference is that a third layer with a LMP agarose is added with the purpose of increasing the distance between cells and the gel surface, as well to fill in any residual holes of the second agarose layer [20].

There is a successful three-layer procedure that is known for generating stable gels and this success is mainly due to the concentration of the agarose gel as well the cells concentration [20]. The first layer, that is coating the microscope slide, usually has a concentration between 1% and 1.5% and it is dried at 40°-50°C [20]. The second layer, which contains the cells, is usually between 0.5% and 1% agarose concentrated, and it is added to the first a few days later. And finally, the third layer is at the same concentration as the second [20].

These parameters are really important because they can influence the final results: usually we only need a few cells to perform the Comet Assay because higher density of cells can result in comets overlapping, complicating image analysis. Additionally, higher agarose concentrations can affect the extent of DNA migration [20].

### **b) Lysis of cells.**

This step consists on putting the agarose slides solidified in a lysis solution, in order to remove membranes, soluble nuclear and cell components, leaving DNA attached to the nuclear matrix [13]. Generally, the slides are in the solution for at least one hour, at 4°C [13], but this period depends on the cell type. This lysis solution is composed by salts and detergents highly concentrated (e.g. EDTA, Sodium Chloride, DMSO, Triton X-100) and its constitution also depends on the cell type. There are different types of lysis solutions according to different authors [17] [20].

### **c) Alkali Unwinding**

At the end of the lysis, the slides containing highly condensed DNA of the treated cells (nucleoid) [13] are incubated in an alkaline (pH > 13) electrophoresis buffer (EDTA and Sodium Hydroxide, pH > 13) [20], in order to produce single-stranded DNA and to express ALS as SSB. For most purposes, it is demonstrated that 20 minutes are sufficient for alkali unwinding (Singh *et al.*, 1998) but this length of time varies between studies and among investigators [20] [21].

### **d) Electrophoresis**

After alkali unwinding, the next step is the electrophoresis under alkaline conditions, using the same pH buffer as the previous step [17]. Usually it is performed for a short period of time (20 to 30 minutes) [13] and conducted at the temperature of 5°C to room temperature, depending on the cell type and the purpose of the experiment, although the use of lower temperatures is thought to provide increased reproducibility [20]. The typical voltages for electrophoresis are low, with the recommended voltage gradient ranging from about 0.5 to 1.47 V/cm [17] [21].

### **e) Neutralization of Alkali**

After electrophoresis, the neutralization step occurs, which consists in neutralizing the alkali in the gels with a suitable buffer (e.g. PBS) [13]. Usually, three washes of the slides with the buffer are sufficient but increased rinsing may be useful in situations where a high background is seen during scoring [20]. After the neutralization, comets can be scored immediately or later, when convenient. However, slides should be scored with a reasonable length of time (e.g. 24 hours) to avoid excessive diffusion of the DNA in the gel [20].

### **f) DNA Staining and Comet Visualization**

DNA staining is usually performed with fluorescent dyes, such as ethidium bromide (one of the most commonly used – [15]) or DAPI, and then visualized by fluorescence microscopy. However, this selection depends largely on the investigator-specific needs and depending on the dye, certain types of DNA strand breaks can be visualized better [15].

Then, the fluorescence can be measured at a suitable magnification on a fluorescence microscope equipped with specific detectors or a digital camera [13]. Nonfluorescent techniques for visualizing comets include staining DNA with silver nitrate [20], which demonstrated to increase the sensitivity/reproducibility of the assay compared with the fluorescent staining [17].

Furthermore, it is recommended to perform a scanning of the gel so that we can select the comets. This selection is very important because those comets will represent the whole gel, therefore, this procedure should be as narrow as possible [20]. We must avoid the comets present around areas with air bubbles, comets with big tails and be cautious not to have gels too densely packed with cells (gels should have less than  $2 \times 10^4$  cells) [15].

### **g) Comet Scoring**

There are several different software packages and methods for quantifying DNA migration by this assay. An image analysis technique for individual cells is the most flexible approach for collecting comet data (e.g. Comet Assay IV™ software) – [17] [13]. However, methods not based on image analysis systems are as useful [20]. The most commonly used parameters are tail length, relative fluorescence intensity of tail (normally expressed as % of DNA in tail), and tail moment [15].

Relative fluorescence tail intensity is the most useful parameter as it gives a clear indication of what the comets actually looked like and it represents the intensity of the comet tail relative to the total intensity (head plus tail) [13]. Additionally, it is relatively unaffected by threshold settings, it bears a linear relationship to break frequency and allows discrimination of damage over the widest possible range [15]. The tail length is defined as the distance from the center of gravity of the nucleus, i.e. the position of the maximum fluorescence intensity over the nucleus, to the end of the tail, however, this method gives limited information, since the tail length only increases at the lowest levels of damage and soon becomes maximal, reducing the useful range of the assay [22]. The tail moment is defined, essentially, as the product of tail length and the tail intensity [11] [22], being a way of expressing both measurements in a single value. But one of the main disadvantages of this method is that tail length is a factor that is used to calculate tail moment and so, similar amounts of damage can give rise to different values of tail moment [22] [25]. This is a valid reason for prefer % tail DNA, which is insensitive to this effect [22]. In short, these

procedures are not as recommended as relative fluorescence tail intensity [15]. It is recommended to examine at least 50 comet images from each slide [26].

Another approach consists in evaluating comets appearance, directly through observation with human eye, in five levels of damage, which zero (no tail) to four (almost all of the DNA is present in the tail) gives sufficient resolution [15]. It is also a fast and simple technique, which can be a good choice if we want to avoid expensive methods [20]. It was demonstrated that computer score and visual score have a very good correlation between them, giving approximate results [15] [22].

### **2.1. The Comet Assay: Modifications for a Purpose**

As discussed above, nanoparticles can induce genotoxicity derived from other processes [27] [28]. Besides the fact that the comet assay detects direct DNA damage through the recognition of strand breaks, this assay can also detect genotoxicity induced by indirect and secondary mechanisms, alongside certain modifications [29]. Among several, oxidative stress is one of the most probable pathways in the induction of oxidative DNA damage and a possible indicator for cancer risk and accelerated aging [13] [30]. It is known that reactive oxygen species (ROS) are produced and released continuously by the mitochondrial respiratory chain, which is attenuated by the antioxidants, that prevent ROS from damaging biomolecules such as lipids, proteins and nucleic acids. Commonly, there is a homeostasis between these processes, however if there is an excessive production of ROS or deficient antioxidant defenses, then occurs oxidative stress [13] [30].

Lipid peroxidation products are very probably involved in the production of arterial plaques, which cause or contribute to strokes, coronary heart disease, thrombosis, among others. Additionally, when inflammation is present, the response from the organism includes the production of ROS by macrophages, whose activation leads to the release of free radicals [30].

There are several methods that can measure oxidative stress, including the comet assay but not in its basic form. A modification that is applied to the comet assay protocol for measuring oxidative DNA damage is the incorporation of bacterial repair endonucleases with appropriated specificities [31]. These enzymes, such as endonuclease III or Formamidopyrimidine DNA Glycosylase (FPG), recognize oxidized pyrimidines or oxidized purines (e.g. 8-oxo-guanine), respectively, removing them from the strand and therefore,

leaving an Apurinic/Apyrimidinic site (AP site). An associated AP-endonuclease activity then creates a break at the site of the oxidized bases, allowing the comet assay to detect those additional breaks [13] [30].

Another modification on the comet assay that has been growing among investigators is the Comet-FISH technique [32]. This method detects region-specific DNA damage in individual cells, through the combination of the conventional comet assay with the technique of Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH), which can detect specifically labeled DNA sequences of interest, including whole chromosomes, through the use of probes of complementary DNA (cDNA) or oligonucleotides to recognize the sequences of interest [15] [33]. Therefore, knowing the genetic sequences that are particularly linked with certain diseases that occur due to alterations on genetic material (e.g. cancer) [34], we can study the potential of possible genotoxic materials (e.g. nanoparticles), through the Comet-FISH technique [33] [35].

These methods demonstrate the importance of the comet assay in the prevention of diseases and therefore, the potential as diagnostic techniques.

## **2.2. The Comet Assay: Possible Limitations for Nanoparticles**

There are still some factors that may create hesitation on using this assay to evaluate nanoparticles genotoxicity. One of them relates to the fact that, initially, the comet assay was developed to measure DNA damage induced by soluble chemicals and what happens is that nanoparticles remain during the assay and are not removed [16]. Therefore, it is thought that nanoparticles can generate false levels of damage and that their presence within the nucleoid could affect DNA migration, as they are present in or in contact with cells, during the comet assay [16].

Ferraro *et al.* investigated this issue, by running the assay just in the isolated nuclei instead of the whole cells and concluded that this method resulted in an approximated result of the real level of genotoxicity induced by the nanoparticles, compared to the conventional one [16].

However, recent studies have showed that there is a strong consistency between results of the comet assay and other genotoxicity tests (e.g. micronucleus assay), concluding that this method can be trusted to evaluate nanoparticles genotoxicity [13].

### 3. Nanotoxicology Assessment

The term “nanotoxicology” emerged to the scientific doors near 2004 as a multidisciplinary science [36] [37] [38], since there was an urgency in evaluating the potential harmful effects of nanoscale materials/particles on biological systems, as well as the severity and frequency associated with it, in terms of exposure to organisms and to the environment [39] [40]. This need was related to the fact that nanotechnologies and nanomedicines are in a progressive market and scientific growth [41] and additionally because it was verified that the physical and chemical characteristics of nanoparticles were different from the respective bulk materials [42]. Therefore, we can't extrapolate the safety data of the elements to the final product and that is why we need a toxicology assessment of nanoformulations, for guaranteeing their safety along with their quality and efficacy.

There are several factors that can affect the toxicity of a nanoparticle, but the most relevant ones are the size, shape and surface area, the surface characteristics, the stability of nanoparticles, the impurities that constitute the raw materials as well as their manufacturing methods and the routes of exposure [43] [44] [45] [46] [47].

The size and surface area of nanoparticles are characteristics that have a huge impact on how they interact with cells because studies indicate that the higher the reduction of their size, the more toxic and reactive they become [48]. This happens because an increase in the superficial area/volume ratio occurs and consequently the probability of interacting with cellular organelles becomes bigger [48]. Therefore, nanoparticles with smaller dimensions have a higher capacity to, for example, reach the cells core and the increased possibility to interact with DNA, being more likely to cause DNA damage.

In terms of route exposure, there are different barriers and obstacles that a nanoformulation needs to overtake, in order to achieve the pretended target. Nanoparticles can enter the body naturally (unintentionally) or induced artificially (intentionally) through skin, lungs, by mouth and even the eyes, which may lead to its deposition in several organs and may cause adverse biological effects [49]. Parenteral administration is also included as a potential route, entering the body artificially, with animal studies demonstrating that through the blood stream nanoparticles can translocate to other organs [50].

In an era where treatments and therapeutics are overloaded, diagnostics becomes even more important to prevent future diseases. Since the comet assay is a simple technique for evaluating genotoxic effects of nanoparticles in cells, its application in the nanotoxicology



assessment field is becoming more frequent [51]. To demonstrate its continuous increasing practice, several studies on different types of nanoparticles aimed to different types of exposure routes are here revised.

### **3.1. Oral Nanoformulations**

Oral nanoformulations for drug delivery are designed mostly to carry substances that can, for example, be susceptible to proteolysis or being poorly absorbed in the gastrointestinal tract [52]. These nanoparticles can suffer systemic absorption and be captured by macrophages, that are present in several organs like the liver, spleen and kidneys, where nanoparticles can accumulate and cause toxicity [53]. Since liver is the site for first-pass metabolism, this organ is particularly vulnerable to the toxicity induced by nanoparticles, as they reveal to accumulate there, even long after cessation of exposure [54]. On the other side, some investigators have reported that nanoparticles may be absorbed across the gastrointestinal tract via the lymph nodes, ultimately transmigrating to the liver and spleen [55]. Additionally, the gastrointestinal tract can also be affected with the accumulation of nanoparticles [56].

Intestinal epithelium cells (e.g. Caco-2, HT29 and SW480) are often used in experimental models for studying the toxicity of ingested nanoparticles [54].

#### Poly(anhydride) Nanoparticles

One particular example of nanocarriers that are considered promising for the oral drug delivery are the Poly(anhydride) Nanoparticles, as they have singular properties such as their biocompatibility, biodegradability, releasing drugs capacity in a sustained way and their modifiable surface, which can enhance or reduce bioadhesion to specific target cells. Additionally, these nanoparticles have the ability to develop intense adhesive interactions within the gut mucosa, prolonging the residence time of the nanocarrier form in close contact with the absorptive epithelium, and have an easy-to-produce profile [57].

Despite all these characteristics, there is still limited information about their toxicological profile. Iglesias *et al.* performed an experiment to investigate the capacity of two poly(anhydride) nanoparticles, Gantrez<sup>®</sup> AN 119-NP (GN-NP) and Gantrez<sup>®</sup> AN 119 covered with mannosamine (GN-MA-NP), and their main bulk material (Gantrez<sup>®</sup> AN 119-

Polymer), to induce DNA damage in L5178Y TK<sup>+/−</sup> mouse lymphoma cells, after 24h of exposure to different concentrations (7.4 to 600 µg/mL) [57].

In order to evaluate the possible genotoxicity of these nanoparticles and bulk material, the comet assay was performed in combination with the enzyme FPG, in order to detect altered bases in addition to DNA strand breaks (SBs) and ALS [57].

GN-NP and GN-MA-NP were submitted to characterization, presenting a homogenous size around 220 and 260 nm of diameter, respectively, and an average Zeta Potential (ZP) of -32 and -40 mV, respectively. Previous studies performed in the same nanoparticles with the same team in 2017, have demonstrated their negative surface charge and that these nanoparticles were not genotoxic to Caco-2 cells. However, the mouse lymphoma cells were more sensitive to nanoparticles than Caco-2 cells and therefore, *Iglesias et al.* wanted to test again the comet assay, to make sure that there was no genotoxicity associated with these types of nanoparticles. Results showed that GN-NP and GN-MA-NP did not induced significant SBs nor ALS and FPG-sensitive sites in mouse lymphoma cells. On the opposite side, the GN-Polymer showed an increase in the net FPG-sensitive sites, at the highest concentration tested (600 µg/mL) [57].

These conclusions permit to contribute to the safety assessment of the empty poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery, addressing to the fact that they demonstrate a safe profile in terms of genotoxicity evaluation [57].

### Magnesium Oxide Nanoparticles

Magnesium Oxide Nanoparticles (MgO NPs) are considered very attractive due to their unique properties, extensive applications, chemical stability. However, despite these characteristics, there is still a serious lack of knowledge related to their safety and impact in human health [58].

Mangalampalli *et al.* wanted to investigate acute oral toxicity of MgO NPs and MgO microparticles (MgO MPs) *in vivo*, not only to compare the toxicity profile between the two types of particles, but also because this type of study with this type of NPs, in female albino Wistar rats, has not been previously explored. Therefore, genotoxicity studies were also included in this toxicity assessment, through the conducting of different types of assays, including the Comet Assay [58].

The MgO NPs and MgO MPs presented an average size of 53 nm and 12  $\mu\text{m}$ , respectively and the ZP of the nanoparticles was found to be -11.6 mV. The rats were treated with 100, 500 and 1000 mg/Kg doses of MgO NPs and MPs at various sampling times (24h and 72h). The whole blood was withdrawn from retro-orbital plexus of the animals and liver tissues were isolated from the rats after sacrificing [58].

Peripheral blood lymphocytes (PBL) and liver cells were analyzed through the alkaline comet assay, showing that both of them presented a significant increase in % tail DNA at 1000 mg/Kg dose of MgO NPs, at the 24h and 72h sampling times. With the MgO NPs, at the dose of 500 mg/Kg, a significant % tail DNA was observed at the both sampling periods, in liver cells, whereas in PBL were only at the 24h sampling period. No significant damage was observed in all doses of MgO MPs and at the dose of 100 mg/Kg of MgO NPs, compared to the control group. Additionally, it was noticed that gradual reduction in the % tail DNA occurred with the passage of time, which may be due to the action of the complex DNA repair mechanism [58].

This study addressed the fact that size is a very important characteristic from a toxicological standpoint, as it showed that nanoparticles induced more genotoxicity than microparticles.

#### Solid Lipid Nanoparticles (SLN)

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) have been used for medical purposes, especially Cationic Solid Lipid Nanoparticles (cSLN), as they constitute colloidal carriers for genes or drugs, particularly, lipophilic drugs and can increase the encapsulation efficacy of some of them [59] [60]. However, cationic lipids/surfactants are known to interfere with cellular membrane integrity more easily and therefore, nanoparticles constituted by these layers have more probability of being internalized by cells. Additionally, there is an enhanced possibility of these nanoparticles interact with the DNA, which may cause genotoxicity [60].

Doktorovova *et al.* decided to explore this possibility, by testing three formulations of cSLN, cSLN-A, cSLN-B and cSLN-C, in a model of hepatotoxicity (HepG2 cells) and a model of a biological barrier (Caco-2 cells), to perform the comet assay. The formulations cSLN-A and cSLN-B were constituted by a crystalline solid lipid core and had the cationic lipid/surfactant co-forming the lipid core whilst the cSLN-C formulation had the cationic lipid/surfactant layer at the nanoparticle surface. The three formulations were tested at the

concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 mg/mL, respectively and cells were treated with these concentrations, for 24h [60].

The three formulations were characterized in terms of size, Pdl, ZP and Total Surface Area (TSA). cSLN-A formulation demonstrated a size of 141 nm of its nanoparticles, with a Polydispersity Index of approximately 0.421, a ZP of about 55 mV and a TSA of  $4.0527E^{-02}$  m<sup>2</sup>. Nanoparticles from cSLN-B formulation presented an average size of 173 nm, with a Pdl of approximately 0.336, a ZP of about 61.2 mV and a TSA of  $3.3031E^{-02}$  m<sup>2</sup>. And nanoparticles from cSLN-C formulation had a size of about 222 nm, with a Pdl of about 0.354, with a ZP of approximately 72.5 mV and a TSA of  $2.5740E^{-02}$  m<sup>2</sup> [60].

Results demonstrated that exposure to 0.01 mg/mL concentrations did not induce DNA damage for both cell-lines and all treatments compared to the negative control, but it was noticed that the % DNA tail increased with the increasing of the formulations concentration, which was not statistically significant in most cases [60].

In HepG2 cells, it was observed a significant DNA damage in the cSLN-C formulation at the concentration of 1.0 mg/mL, compared with the negative control and the other formulations at the same concentration [60].

In Caco-2 cells, cSLN-C induced significant DNA damage at the concentrations of 0.1 and 1.0 mg/mL, whilst the other formulations cSLN-A and cSLN-B did not induce a significant increase in DNA damage, comparing with the negative control, at all concentrations [60].

Along with the comet assay, it was also performed the comet assay with FPG-treatment, whose results represented the total DNA strand-breaks and DNA oxidation damage. It was observed, in general, an increase of the % DNA tail in all treatments, in both cell lines, compared to the comet assay without FPG-treatment. However, differences were only significant for 0.1 and 1.0 mg/mL concentrations, in the cSLN-C formulation, for HepG2 cells and only significant for 1.0 mg/mL concentration in the cSLN-C, for Caco-2 cells, compared with the negative controls [60].

Since the cSLN-C formulation was the one demonstrating more DNA damage at the highest doses, it is possible that the fact of the cationic lipid/surfactant layer being on the surface of the nanoparticles may interact more with the cells than being co-forming the core. However, authors defend that these results are not significant, as they reveal that the concentration of 1.0 mg/mL is already cytotoxic to cells. They also concluded that the

production process of the nanoparticles can also influence the interaction of the nanoparticle with the cell, which can cause different levels of DNA damage [60].

### **3.2. Skin Nanoformulations**

The skin is one of the largest organs of the body and functions as the first-line barrier between the external environment and the internal organs of the human body [54], becoming, therefore, an important portal route for entry of nanoparticles in the human body [61]. Skin exposure to nanoparticles can occur both through occupational and non-occupational contact from the use of cosmetics and topical drug treatments. Topically applied NPs can potentially penetrate the skin and reach the systemic circulation and induce adverse effects on a systemic scale [54]. However, research have showed that nanoparticles typically did not penetrate beyond the epidermal region into the dermal layers and therefore, could not reach the systemic circulation, which demonstrates that in intact skin it is unlikely for nanoparticles to penetrate the deeper layers of the skin. On the opposite side, if the skin is compromised with lesions on the surface, it is highly probable that nanoparticles reach the blood circulation [62] [63] [64].

The toxicity of nanoparticles that enter body through dermal route is normally studied in keratinocytes, fibroblasts, and, more rarely, sebocytes (cells of sebaceous glands) [54].

#### Titanium Dioxide Nanoparticles

Titanium Dioxide Nanoparticles ( $\text{TiO}_2$  NPs) are considered one of the most commonly used Metal Oxide Nanoparticles with applications in several areas, including as a coating material in pharmaceutical nanocarriers [61]. Also, their properties make them very appealing as an ingredient for commercial sunscreens and cosmetics, as these nanoparticles have UV-light blocking abilities and confer better transparency and aesthetics to creams [54], offering clear transparent appearance upon topical application [61]. Among the possible exposure routes, inhalation and skin exposure are considered most important for NPs. Several studies demonstrated that Titanium Dioxide Nanoparticles induce various adverse cellular effects, including oxidative stress and DNA damage [61].

A Shukla *et al.* study was conducted in human epidermal cells (A431), to assess the uptake and cellular toxicity, including genotoxic potential of Titanium Dioxide Nanoparticles [61]. This one in particular was assessed by two assays: the Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome (CBMN) assay and the FPG-Comet Assay. In this last one, the cells were exposed for 6h to different concentrations of a TiO<sub>2</sub> Nanoparticles suspension (0.008, 0.08, 0.8, 8 and 80 µg/mL), to detect oxidative DNA base damage, in particular, 8-OH guanine. TiO<sub>2</sub> nanoparticles had an average size of 50 nm. The results showed that the DNA damage was enhanced at the three higher concentrations (0.8, 8 and 80 µg/mL), since the DNA tails were higher at those concentrations [61].

In commercial sunscreens, the concentration of TiO<sub>2</sub> NPs present in those formulations is superior than the ones used in this study, however, considering the fact that some NPs may persist on skin even after the cream is washed off and the fact that they could gain entry inside the skin in case it is damaged, the concentrations used in this study are realistic. These findings show that there is a great probability of these nanoparticles inducing genotoxicity in human epidermal cells [61].

### Quantum Dots

Quantum Dots (QDs) are semiconductor crystals with superior fluorescent properties constituted by a semiconductor inorganic core, an inorganic shell and an aqueous organic coating, which improves their water solubility, core durability and desired bioactivity [65] [66]. Generally, these nanoparticles own a diameter between 1 and 10 nm and are composed of metal elements from the groups II-V, with Cadmium (Cd) being one of the most used [65] [66] [67].

Several studies demonstrate that Cd is extremely toxic if allowed to leach into the environment and it has the capacity of inducing DNA damage. Additionally, in the cellular environment may lead to the formation of ROS, resulting in cell death [68] [69].

Therefore, in order to investigate their genotoxic potential for biological systems and environment Ju *et al.* performed the neutral comet assay on two different sizes, 4-5 nm and 8-10 nm, respectively, of QDs with a core/shell of Cadmium Selenide/Zinc Sulfide (CdSe/ZnS) and on QDs with the same core/shell type but coated with a Polyethylene Glycol (PEG) thin-layer, in order to see the effects that a coating can make in the induction of DNA damage compared to the QDs without coating. The sizes were also according to

the size range commonly available. Other studies have shown that surface plays an important role in nanotoxicity and for that, PEG-incorporation on QDs could be a form to decrease the respective toxicity [65].

The uncoated QDs and PEG-QDs of the two sizes were employed for 8h, at the concentrations of 8 nM and 80 nM, with human skin fibroblasts (HSF-42), an established *in vitro* model for cellular toxicity. Since the skin is one of the most probable routes of entry for nanoparticles in humans, it was important to study the possible genotoxicity of these systems for skin cells [65].

After the performance of the neutral comet assay, the results, after 2h of exposure, showed that uncoated QDs induced significant DSBs at both concentrations, with an increase in the tail moment at the highest concentration, while PEG-QDs showed no significant changes in results of the tail moment, compared to the control [65]. These outcomes encourage the fact that a proper surface modification in QDs can make the difference on their interaction with skin cells. In fact, the PEG-coating layer may prevent the cadmium leakage, thereby minimizing the generation of ROS by QDs and therefore reducing possible genotoxicity induction. Moreover, the uncoated QDs induce genotoxicity in a time- and dose-dependent manner. The long-term consequences of the exposure to QDs still require further investigation [65].

### Zinc Oxide Nanoparticles

Similarly to TiO<sub>2</sub> NPs, Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) have a widely range of applications in several industry fields, including cosmetics, personal care products and sunscreens, mainly due to their antimicrobial and ultraviolet (UV) light absorption properties [70] [71]. Studies demonstrate that ZnO NPs are highly reactive compared to their bulk-sized ZnO particles, having those properties enhanced compared to the last ones and may induce genotoxicity and oxidative stress in human cells [72]. The fact that these nanoparticles are present in sunscreens (generally between 4 and 30% wt/wt) and exposed to UV radiation, along with the fact that they may induce ROS generation, encouraged Pal *et al.* to investigate the capacity of ZnO NPs to induce DNA damage in primary mouse keratinocytes (PMKs) from Swiss Albino Mice, along with UVB-exposure [70].

The ZnO NPs had an average size of 32 nm and presented a zeta potential of -9.21 mV and were in contact with PMKs for 24h, at the concentration of 1 µg/mL. To assess the

possible genotoxicity effect of these nanoparticles, it was performed the alkaline comet assay in PMKs exposed to UVB alone, PMKs exposed to ZnO NPs alone and PMKs exposed to both in combination. Results showed that tail moments value was greater in the combination groups compared to ZnO-NPs and UVB alone groups [70].

Another investigation with the alkaline comet assay, from Sharma *et al.*, with ZnO NPs (Size and Zeta Potential of 30 nm and -15.8 mV, respectively) on primary human epidermal keratinocyte (HEK) (the most abundant cell type in human epidermis), concluded also that these nanoparticles induced significant genotoxicity on those cells, at the concentrations of 14 µg/mL, when in contact for 6h, compared to the control [73].

### **3.3. Inhaled Nanoformulations**

The avoidance of the first-pass metabolism and therefore, the reduction of systemic side effects is just one of the many characteristics that make the lung an attractive target for drug delivery. In this context, research has been done to explore the advantages of nanocarrier systems for pulmonary drug delivery [54]. However, because lungs have a large surface area and the possibility of localization and accumulation of drugs within the pulmonary tissue, the possibility of nanoparticles inducing toxicity is even bigger than the conventional drugs. Studies have shown that nanoparticles with the size of about 50 nm lead to the perforation of the membranes of type I alveolar cells, with the consequence of their internalization in the cells [54].

Commonly, the toxicity of inhaled nanoparticles is studied using the cell lines that model different tissues of the respiratory system, e.g., A459 and C10 cells of pulmonary origin, alveolar macrophages (RAW 264.7), various epithelial cells and fibroblasts (BEAS-2B, NHBE, I6-HBE, SAEC), as well as human monocytes (THP-1) [54].

#### Carbon Black Nanoparticles

Carbon black particles (CB NPs) have been classified as a possible human carcinogen (group 2B) by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [74] and yet, carbon black is applied largely in chemical industry for the production of rubbers, toners, paints. Therefore, there is a risk of occupational exposure through inhalation during the handling of dry powders and then of ultrafine particles of carbon black [75].



Studies have shown that CB NPs had the capacity to induce ROS in both cellular and acellular assays and demonstrated to provoke DNA strand breaks in lungs.

Kyjovska *et al.* studied this possibility by administering, by intratracheal instillation, a single dose of 0.67, 2, 6 and 162  $\mu\text{g}/\text{animal}$  of CB NPs (size: 14 nm) to mice (8 mice for each dose). The animals were killed 1, 3 or 28 days after nanoparticles exposure, collecting the lungs, liver and Broncho-Alveolar Lavage (BAL) and performing the alkaline comet assay on the respective cells' suspensions [75].

The results demonstrate that there was DNA damage in the BAL, after one day of exposure to 0.67 and 2  $\mu\text{g}/\text{animal}$  and it was significant for the 0.67, 2 and 6  $\mu\text{g}/\text{animal}$  dose, 28 days postexposure [75].

In the lungs, there was no significant DNA damage on the three lower concentration groups, after one day of exposure, but there were detected significant strand breaks at the highest dose. After 28 days, 2 and 6  $\mu\text{g}/\text{animal}$  caused a significant increase in the level of DNA damage [75].

In the liver, it was not detected DNA damage at any doses and time-points of exposure [75].

It was observed a lack of dose-response relationship in this study [75].

### Gold Nanoparticles

Gold Nanoparticles (AuNPs) have been attracting scientific interest not only to their facile synthesis and surface bioconjugation, but also for their unusual optical, electronic and thermal properties [76]. Therefore, these nanoparticles have large medical applications [77]. However, their possible nanotoxicity effects are still unknown [78].

Ng *et al.* studied the possibility of AuNPs of 20 nm inducing genotoxicity on small airway epithelial cells (SAECs), exposing these cells to concentrations of 1 nmol/L (equivalent to 48.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to AuNPs, through the *in vitro* alkaline comet assay, for 72h [78].

It was observed DNA damage at this concentration of AuNPs, through the observation of a significant increase of the tail moment, compared to the control [78].

### **3.4. Ocular Nanoformulations**

Ocular drug delivery has been a major challenge for ophthalmic drug development, due to intricate and unique anatomical and physiological barriers in the eye, that protect it from the invasions of environmental toxicants and microorganisms and keep the systemic circulation from the ocular tissues [79] [80].

These barriers make the eye a highly protected organ and therefore, when an ocular disease occurs, it becomes very difficult to treat with medications, especially in the posterior segment of the eye [80] [81]. To treat this area, several delivery modalities have been applied, such as intravitreal injection, which is the gold standard method for posterior drug delivery. Subretinal injection, subconjunctival injection and topical administration are also used. However, these are not satisfactory, since they are invasive procedures with a lot of risks associated with it. Therefore, a better approach still needs to be further explored [80].

Current developments in nanoformulations of drug carrier systems have become a promising attribute to enhance drug retention/permeation and prolong drug release in ocular tissue, providing novel opportunities to overcome the limitations of conventional drug delivery systems [80].

From previous studies, it is known that particles with the size bigger than 1  $\mu\text{m}$  may potentially cause ocular irritation. Therefore, nanoparticles for ocular therapeutics can be an advantage to reduce the sensation and irritation of the eye, as well, to enhance bioavailability of topical administration, achieve controlled release, targeted delivery, reduce frequency of administration with improved patient compliance and, ultimately, improved therapeutics efficacy [80].

#### Zinc Oxide Nanoparticles

ZnO NPs constitute a type of metal oxide nanoparticles with promising applications in medicine, such as cell imaging and drug delivery. Their photocatalytic and photo-oxidizing properties against chemical and biological species, make these particles very pleasant to the cosmetics, food additives and personal hygiene products. Additionally, zinc is proven to stimulate the immune system and demonstrated anti-inflammatory abilities. Recent studies showed that ZnO NPs can induce cytotoxicity effects, accompanied by oxidative stress and

genotoxicity, in leukemia and hepatocarcinoma cells *in vitro*, suggesting their application for the treatment of cancer therapy [82].

To explore their application in future ocular drug delivery and the possibility of inducing genotoxicity in ocular tissue, Guo *et. al* performed a study, using a RGC-5 cell line, since the rat retinal ganglion cells were more susceptible to outer surroundings than other eye cells [82].

The cells were exposed to different concentrations (0, 2.5, 5.0 and 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of ZnO NPs for 6h. These nanoparticles were characterized in terms of size, demonstrating an average diameter of 100 nm. The results showed that untreated cells had an intact nucleus, with no comets formed unlike the treated cells, whose damage increased with the increase of the ZnO NPs concentration [82].

### Cerium Oxide Nanoparticles

Cerium Oxide Nanoparticles ( $\text{CeO}_2$  NPs) are known for their antioxidant and optical properties and for having high affinity to the oxygen [83]. Therefore, apart other purposes, these nanoparticles may constitute a potential mean for ophthalmic drug delivery and imaging of the ocular tissue, with the possibility of helping to treat eye diseases such as cataract and glaucoma [83] [84]. Studies involving the effects of  $\text{CeO}_2$  NPs on eye lens revealed that they suggest having a protective effect on retina [83].

The outcomes of these nanoparticles on biological tissues and cells are not well known, since their application in medicine is just beginning to be exploited. Therefore, it is important to investigate further their possible toxicity effects, such as the potential induction of DNA damage, since these consequences, for example at the level of the eye tissue, could lead to hazardous effects on the formation of eye cells and structural proteins, leading to future diseases [83].

Pierscionek *et al.* investigated this possibility in three replicated cultured human lens epithelial cells, with the alkaline comet assay, incubating the cells with two sets of  $\text{CeO}_2$  NPs, with the average size of 5.5 nm: one set with the concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the other set with the concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [83].

The comets were scored by % of DNA head and tail, tail length and olive tail moment and results demonstrated low level of DNA damage in all data sets. On the cells treated

with the highest dose, there was a slightly increase in the % of DNA tail, however, there was not statistical significance between control and treated cells of either concentration [83].

### **3.5. Parenteral Nanoformulations**

Parenteral nanoformulations are the most applied ones in nanomedicine and in biomedical fields, particularly in therapeutics and diagnostics, as drug carriers and contrast agents, respectively. Nano-intravenous administration is a very important route used in determining toxicological profiles of nanoparticles, in biological assessment. Several studies demonstrated that there is a high probability of occurring deposition of nanoparticles in several organs through this type of exposure [85].

The toxicity of these particles is usually studied in primary blood cell cultures, cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), mesenchymal stem cells, mononuclear blood cells and various tumor cell lines (HeLa, MCF-7, PC3, C4-2 and SKBR-3) [54].

#### Silver Nanoparticles

Silver Nanoparticles (AgNPs) are among the most commercially used nanomaterials [86]. These metallic nanoparticles have attracted intense scientific and technical interest due to the unusual optical, electronic and thermal properties [87]. The easy synthesis and surface bioconjugation make these systems very pleasant to drug delivery. They are well-known not only for being excellent antibacterial and antiviral agents, but also for having a great performance as anti-angiogenic agents, with applications in Multiple Myelomas, Leukemia and Rheumatoid Arthritis [88].

With the increasing use of AgNPs, issues on their safety and potential risk to human health have been raised and so scientific research is required to evaluate the potential toxicity and genotoxicity of these nanoparticles, not only *in vitro* but also *in vivo*, because *in vitro* data alone may not be sufficient for hazard identification of nanomaterials. [88]

Several *in vivo* studies, although in a limited quantity compared to the *in vitro* ones, have been carried on, in order to evaluate genotoxicity of AgNPs in the body tissues. [88] It is reported that AgNPs might cause hepatotoxicity due to the generation of ROS [89] [90].

Li *et al.* started to prepare two sets of experiments, each one formed by five 7-week-old male mice (weighing 25-30g), both according to size and coating of the silver nanoparticles. Also, the dose selection was based on the highest available stock solution and intravenous injection volume that a mouse could accept. For set one, the animals were treated intravenously once with 5 nm PVP-coated AgNPs, at doses from 0.5 to 20.0 mg/Kg, to evaluate the possible dose-response effect. For set two, 15-100 nm PVP- or 10-80 nm Silicon-coated AgNPs were intravenously delivered to mice with a single 25 mg/Kg dose or 25 mg/Kg/day for three consecutive days to evaluate the possible effect of size and coating. Additional groups of mice served as negative and positive controls [88].

Three hours after the last treatment of the second set experiment, a sample of the left lateral lobe of a mouse liver was removed and treated in order to perform the alkaline comet assay on the liver cells that were exposed to the silver nanoparticles, since it was considered to be the primary site of clearance for the AgNPs and most likely to be the main site of NP accumulation following the intravenous treatment. After the procedure, no DNA strand-breaks were detected in liver, for both PVP- and Silicon-coated AgNPs in the standard Comet Assay, while significant induction of DNA damage was found in the enzyme-modified Comet Assay, with silicon being the most toxic to the cells. With the addition of nuclease enzymes resulted DNA breaks which suggest that AgNPs can cause oxidative DNA damage [88].

Another study by Kim *et al.* investigated the possible genotoxicity of AgNPs in the liver tissue 7 and 28 days after a single intravenous injection into rabbit ear veins. However, these nanoparticles had a citrate coating (cAgNPs) which conferred a negative surface to the nanoparticles. The size of cAgNPs was approximately 7.9 nm [90].

The suspensions of cAgNPs comprehended a low dose of 0.5 mg/Kg and a high dose of 5 mg/kg that were given, respectively, to two groups of 4 rabbits. The results demonstrated that the damage of DNA in liver tissue was higher in the group of the 5 mg/Kg dose than in the 0.5 mg/Kg. Plus, the DNA damage at day 28 declined compared to the damage at day 7, in the high-dose treated group, which reveals dose- and time-dependent changes in oxidative stress and genotoxicity, after a single injection of cAgNPs [90].

### Titanium Dioxide Nanoparticles

TiO<sub>2</sub> NPs, as discussed previously, are largely used in industry and because of its multiple applications, it becomes necessary to investigate every possible form of these nanoparticles interacting with human body and the possibility of inducing genotoxicity [91], as they are increasingly exposed to human beings by multiple routes [92].

The risk of these particles reaching the endothelium is almost inevitably and can occur before reaching other secondary organs, which can cause endothelial dysfunction and impairments, consequently affecting cardiovascular health [91] [92].

Liao *et al.* investigated the possible impacts of TiO<sub>2</sub> NPs on the cardiovascular system, evaluating the genotoxic potential of four sizes (100, 50, 30 and 10 nm) of TiO<sub>2</sub> NPs in HUVECs, through the comet assay and exposing the nanoparticles to the cells through 4 hours [91].

All the sizes revealed to induce DNA damage and it decreased with the increasing sizes of TiO<sub>2</sub> NPs, revealing the importance of studying the size-effect on inducing cellular responses [91].

### Iron Oxide Nanoparticles

Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) have attracted the biomedical area due to their magnetic properties, possible carriers for gene delivery and cancer therapy and applications in the textile and cosmetics industries [93] [94]. For these motives, it is important to study the possible hazard effects of IONPs [94].

Ansari *et al.* performed the comet assay *in vivo* on male *Wistar* rats with the administration of IONPs through intraperitoneal route, for 7 consecutive days. The animals were divided in 9 groups, each one with 6 animals. Three groups were studied with the concentrations of 25, 50 and 100 mg/Kg of IONPs, respectively [94].

IONPs were characterized for size and shape, showing that they had a spherical shape and the average size of approximate 60 nm [94].

In order to perform the comet assay on the lymphocytes of the rats, the animals were sacrificed and their blood was collected immediately to isolate the pretended cells for the assay [94].

Results showed that the mean tail length increased with the increasing of the IONPs concentration compared with the negative control, with the concentration of 100 mg/Kg having the biggest mean tail length [94].

#### **4. Conclusions and Future Perspectives**

The variety and the complexity of nanomedicines have increased dramatically over the recent years, but the translation of new candidate nanomedicines into the clinic has been limited. The possible causes for such translation may be the lack of established characterization and testing regimes that can provide regulatory authorities (e.g. Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA)) with the necessary data to allow novel nanomedicines into clinical testing [95].

There are currently no tangible strict guidelines regarding toxicity testing for nanoparticles and, therefore, the implementation of new nanomedicine characterization technologies or the adaptation of current ones should be done in close interaction with regulatory authorities, to ensure that the new data acquired on candidate nanomedicines will actually help increase their clinical translation and contribute to significant improvements in healthcare on the global scale [96].

In general, the strategies used for conventional drug products have been adapted to evaluate the safety/toxicity and biocompatibility of nanomedicines [97] and, therefore, there is an urgency in proving that these methods are adaptable and viable for nanotoxicity evaluation.

Through the review of several studies on the genotoxicity assessment of nanoparticles with the comet assay, we selected different types of nanoparticles destined to different routes of exposure (oral, skin, ocular, inhalation and parenteral nanoformulations) that were considered not only to be future candidates for drug carriers or used as diagnostic agents but also for their very close contact and high probability of being exposed to the environment and to organisms.

We concluded that investigations were mostly carried out in metal and metal oxide nanoparticles, perhaps not only due to the fact that they exist in the environment and that we are constantly exposed to them but also because they have widely applications in the food, biomedical and cosmetics industry and therefore, demonstrate a huge potential toxic

profile [98]. Additionally, these nanoparticles in particular demonstrated in several investigations to cause DNA damage, essentially by ROS generation [99] [100].

The comet assay results on the selected nanoparticles revealed their potential genotoxicity through direct and indirect mechanisms and the influence of the exposure route on causing different levels of DNA damage. For example, the TiO<sub>2</sub> NPs demonstrated no relevant genotoxicity through skin exposure, but induced hepatotoxicity and risk for cardiovascular endothelium, considering possible parenteral administration.

Additionally, we can see the importance of considering the concentration dose of the nanoformulation, as well, the nanoparticles characteristics, such as size, surface charge, addition of coating layers and manufacturing process in account, since these factors reveal to influence the genotoxicity capacity of nanoparticles.

In conclusion, the same characteristics that make nanomaterials interesting for many applications, are the same that lead to toxicity from them [12] and, therefore, we must step in to guaranty the safety of nanoparticles, in order to benefit them the most.

The assessment of genotoxicity in nanoparticles can beneficiate from the comet assay, not only because of the characteristics of the assay, but because the current standardized protocols used for assessing the genotoxicity of chemicals not always are suitable for nanogenotoxicology assessment. According to OECD's Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN), there is still necessary an assay that identifies and characterizes DNA damage not only through direct interaction, detecting DNA strand breaks and altered DNA bases, but also through indirect and secondary mechanisms as well (e.g. oxidative stress induced by inflammation) [12].

Therefore, the comet assay may be an excellent method to include in a future strategy for nanotoxicology assessment.



## Bibliographic References

1. Liu, D., et al., *The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential*. *Theranostics*, 2016. **6**(9): p. 1306-23.
2. Ai, J., et al., *Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs*. *Int J Nanomedicine*, 2011. **6**: p. 1117-27.
3. Azqueta, A., et al., *Comet assay to measure DNA repair: approach and applications*. *Front Genet*, 2014. **5**: p. 288.
4. Dobrzynska, M.M., et al., *Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo*. *Toxicology*, 2014. **315**: p. 86-91.
5. Evans, S.J., et al., *Critical review of the current and future challenges associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity*. *Mutagenesis*, 2017. **32**(1): p. 233-241.
6. Jeevanandam, J., et al., *Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations*. *Beilstein J Nanotechnol*, 2018. **9**: p. 1050-1074.
7. Seaton, A., et al., *Nanoparticles, human health hazard and regulation*. *J R Soc Interface*, 2010. **7 Suppl 1**: p. S119-29.
8. Soares, S., et al., *Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues*. *Front Chem*, 2018. **6**: p. 360.
9. Hartmann, A., et al., *Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations*. *Mutagenesis*, 2004. **19**(1): p. 51-9.
10. Zainol, M., et al., *Introducing a true internal standard for the Comet assay to minimize intra- and inter-experiment variability in measures of DNA damage and repair*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(22): p. e150.
11. Wiklund, S.J. and E. Agurell, *Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay*. *Mutagenesis*, 2003. **18**(2): p. 167-75.
12. Azqueta, A. and M. Dusinska, *The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials*. *Front Genet*, 2015. **6**: p. 239.
13. Gleis, M., T. Schneider, and W. Schlormann, *Comet assay: an essential tool in toxicological research*. *Arch Toxicol*, 2016. **90**(10): p. 2315-36.
14. Brendler-Schwaab, S., et al., *The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing*. *Mutagenesis*, 2005. **20**(4): p. 245-54.

15. Collins, A.R., *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations*. Mol Biotechnol, 2004. **26**(3): p. 249-61.
16. Ferraro, D., et al., *Overestimation of nanoparticles-induced DNA damage determined by the comet assay*. Nanotoxicology, 2016. **10**(7): p. 861-70.
17. Vandghanooni, S. and M. Eskandani, *Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system*. Bioimpacts, 2011. **1**(2): p. 87-97.
18. Jha, A.N., *Ecotoxicological applications and significance of the comet assay*. Mutagenesis, 2008. **23**(3): p. 207-21.
19. Cemeli, E., A. Baumgartner, and D. Anderson, *Antioxidants and the Comet assay*. Mutat Res, 2009. **681**(1): p. 51-67.
20. Tice, R.R., et al., *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ Mol Mutagen, 2000. **35**(3): p. 206-21.
21. Azqueta, A., et al., *Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions*. Mutat Res, 2011. **724**(1-2): p. 41-5.
22. Collins, A.R., et al., *The comet assay: topical issues*. Mutagenesis, 2008. **23**(3): p. 143-51.
23. Kumar, A., V. Sharma, and A. Dhawan, *Methods for detection of oxidative stress and genotoxicity of engineered nanoparticles*. Methods Mol Biol, 2013. **1028**: p. 231-46.
24. Vojnovic, B., et al., *A High Sensitivity, High Throughput, Automated Single-Cell Gel Electrophoresis ('Comet') DNA Damage Assay*. Physics in Medicine and Biology, 2013. **1**(1): p. 1-15.
25. Burlinson, B., et al., *Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup*. Mutat Res, 2007. **627**(1): p. 31-5.
26. Olive, P.L. and J.P. Banath, *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 23-9.
27. Nemmar, A., et al., *Impact of Pulmonary Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles on Experimental Acute Kidney Injury*. Cell Physiol Biochem, 2019. **52**(3): p. 439-454.
28. Zhou, F., et al., *The size-dependent genotoxicity and oxidative stress of silica nanoparticles on endothelial cells*. Environ Sci Pollut Res Int, 2019. **26**(2): p. 1911-1920.
29. Hoelzl, C., et al., *Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends*. Mutat Res, 2009. **681**(1): p. 68-79.
30. Collins, A.R., *Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay*. Mutat Res, 2009. **681**(1): p. 24-32.

31. Speit, G., et al., *Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay*. *Toxicol Lett*, 2004. **146**(2): p. 151-8.
32. Gleit, M. and W. Schlormann, *Analysis of DNA damage and repair by comet fluorescence in situ hybridization (Comet-FISH)*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1094**: p. 39-48.
33. Gleit, M., G. Hovhannisyanyan, and B.L. Pool-Zobel, *Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: review*. *Mutat Res*, 2009. **681**(1): p. 33-43.
34. Zheng, T., D. Yuan, and C. Liu, *Molecular toxicity of nanoplastics involving in oxidative stress and desoxyribonucleic acid damage*. *J Mol Recognit*, 2019: p. e2804.
35. Gleit, M., et al., *Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes*. *Toxicol Sci*, 2007. **96**(2): p. 279-84.
36. Donaldson, K., et al., *Nanotoxicology*. *Occup Environ Med*, 2004. **61**(9): p. 727-8.
37. Maynard, A.D., D.B. Warheit, and M.A. Philbert, *The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond*. *Toxicol Sci*, 2011. **120 Suppl 1**: p. S109-29.
38. Clift, M.J., P. Gehr, and B. Rothen-Rutishauser, *Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative*. *Arch Toxicol*, 2011. **85**(7): p. 723-31.
39. Shvedova, A.A., V.E. Kagan, and B. Fadeel, *Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. **50**: p. 63-88.
40. Shvedova, A., A. Pietroiusti, and V. Kagan, *Nanotoxicology ten years later: Lights and shadows*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016. **299**: p. 1-2.
41. Morigi, V., et al., *Nanotechnology in medicine: from inception to market domination*. *J Drug Deliv*, 2012. **2012**: p. 389485.
42. Singh, A.V., et al., *Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design*. *Toxicol Mech Methods*, 2019. **29**(5): p. 378-387.
43. Sukhanova, A., et al., *Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties*. *Nanoscale Res Lett*, 2018. **13**(1): p. 44.
44. De Matteis, V., *Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation*. *Toxics*, 2017. **5**(4).
45. Ray, P.C., H. Yu, and P.P. Fu, *Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs*. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009. **27**(1): p. 1-35.

46. Blanco, E., H. Shen, and M. Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): p. 941-51.
47. Kim, H.A., et al., *Nanoparticles in the environment: stability and toxicity*. Rev Environ Health, 2012. **27**(4): p. 175-9.
48. Gattoo, M.A., et al., *Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 498420.
49. Kaul, S., et al., *Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances*. J Pharm (Cairo), 2018. **2018**: p. 3420204.
50. Lee, J., et al., *Developmental toxicity of intravenously injected zinc oxide nanoparticles in rats*. Arch Pharm Res, 2016. **39**(12): p. 1682-1692.
51. Lovell, D.P. and T. Omori, *Statistical issues in the use of the comet assay*. Mutagenesis, 2008. **23**(3): p. 171-82.
52. Cao, S.J., et al., *Nanoparticles: Oral Delivery for Protein and Peptide Drugs*. AAPS PharmSciTech, 2019. **20**(5): p. 190.
53. Hoshyar, N., et al., *The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction*. Nanomedicine (Lond), 2016. **11**(6): p. 673-92.
54. Yildirimer, L., et al., *Toxicology and clinical potential of nanoparticles*. Nano Today, 2011. **6**(6): p. 585-607.
55. Jani, P., et al., *Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency*. J Pharm Pharmacol, 1990. **42**(12): p. 821-6.
56. Vega-Villa, K.R., et al., *Clinical toxicities of nanocarrier systems*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(8): p. 929-38.
57. Iglesias, T., et al., *In vitro evaluation of the genotoxicity of poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery*. Int J Pharm, 2017. **523**(1): p. 418-426.
58. Mangalampalli, B., N. Dumala, and P. Grover, *Acute oral toxicity study of magnesium oxide nanoparticles and microparticles in female albino Wistar rats*. Regul Toxicol Pharmacol, 2017. **90**: p. 170-184.
59. Thukral, D.K., S. Dumoga, and A.K. Mishra, *Solid lipid nanoparticles: promising therapeutic nanocarriers for drug delivery*. Curr Drug Deliv, 2014. **11**(6): p. 771-91.
60. Doktorovova, S., et al., *Comet assay reveals no genotoxicity risk of cationic solid lipid nanoparticles*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(4): p. 395-403.
61. Shukla, R.K., et al., *ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(1): p. 231-41.

62. Borm, P.J., et al., *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol*, 2006. **3**: p. 11.
63. Schneider, M., et al., *Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. Dermatoendocrinol*, 2009. **1**(4): p. 197-206.
64. T.R.Kuo, C.L.W., C.T.Hsu,W.Lo,S.J.Chiang,S.J.Lin,C.Y. Dong, and C. C. Chen, *Biomaterials* 30. 2009.
65. Ju, L., et al., *Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation. Mutat Res*, 2013. **753**(1): p. 54-64.
66. Matea, C.T., et al., *Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. Int J Nanomedicine*, 2017. **12**: p. 5421-5431.
67. Madani, S.Y., et al., *Conjugation of quantum dots on carbon nanotubes for medical diagnosis and treatment. Int J Nanomedicine*, 2013. **8**: p. 941-50.
68. Wegner, K.D. and N. Hildebrandt, *Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. Chem Soc Rev*, 2015. **44**(14): p. 4792-834.
69. Probst, C.E., et al., *Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. Adv Drug Deliv Rev*, 2013. **65**(5): p. 703-18.
70. Pal, A., et al., *UVB irradiation-enhanced zinc oxide nanoparticles-induced DNA damage and cell death in mouse skin. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016. **807**: p. 15-24.
71. Vandebriel, R.J. and W.H. De Jong, *A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. Nanotechnol Sci Appl*, 2012. **5**: p. 61-71.
72. Scherzad, A., et al., *Molecular Mechanisms of Zinc Oxide Nanoparticle-Induced Genotoxicity Short Running Title: Genotoxicity of ZnO NPs. Materials (Basel)*, 2017. **10**(12).
73. Sharma, V., et al., *Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes. J Nanosci Nanotechnol*, 2011. **11**(5): p. 3782-8.
74. Baan, R.A., *Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. Inhal Toxicol*, 2007. **19 Suppl 1**: p. 213-28.
75. Kyjovska, Z.O., et al., *DNA damage following pulmonary exposure by instillation to low doses of carbon black (Printex 90) nanoparticles in mice. Environ Mol Mutagen*, 2015. **56**(1): p. 41-9.
76. Chen, P.C., S.C. Mwakwari, and A.K. Oyelere, *Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. Nanotechnol Sci Appl*, 2008. **1**: p. 45-65.

77. Dykman, L.A. and N.G. Khlebtsov, *Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects*. Acta Naturae, 2011. **3**(2): p. 34-55.
78. Ng, C.T., et al., *Toxicological profile of small airway epithelial cells exposed to gold nanoparticles*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. **238**(12): p. 1355-61.
79. Patel, A., et al., *Ocular drug delivery systems: An overview*. World J Pharmacol, 2013. **2**(2): p. 47-64.
80. Tsai, C.H., et al., *Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
81. Behar-Cohen, F., *[Drug delivery to target the posterior segment of the eye]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(6-7): p. 701-6.
82. Guo, D., et al., *Zinc oxide nanoparticles induce rat retinal ganglion cell damage through bcl-2, caspase-9 and caspase-12 pathways*. J Nanosci Nanotechnol, 2013. **13**(6): p. 3769-77.
83. Pierscionek, B.K., et al., *Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells*. Nanotechnology, 2010. **21**(3): p. 035102.
84. Kompella, U.B., R.S. Kadam, and V.H. Lee, *Recent advances in ophthalmic drug delivery*. Ther Deliv, 2010. **1**(3): p. 435-56.
85. De Jong, W.H., et al., *Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration*. Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1912-9.
86. Burdusel, A.C., et al., *Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview*. Nanomaterials (Basel), 2018. **8**(9).
87. Mody, V.V., et al., *Introduction to metallic nanoparticles*. J Pharm Bioallied Sci, 2010. **2**(4): p. 282-9.
88. Li, Y., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse*. Nanotoxicology, 2014. **8 Suppl 1**: p. 36-45.
89. Patlolla, A.K., D. Hackett, and P.B. Tchounwou, *Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats*. Mol Cell Biochem, 2015. **399**(1-2): p. 257-68.
90. Kim, Y.J., et al., *Assessment of in vivo genotoxicity of citrated-coated silver nanoparticles via transcriptomic analysis of rabbit liver tissue*. Int J Nanomedicine, 2019. **14**: p. 393-405.
91. Liao, F., et al., *The size-dependent genotoxic potentials of titanium dioxide nanoparticles to endothelial cells*. Environ Toxicol, 2019.

92. Zeng, C., et al., *The size-dependent apoptotic effect of titanium dioxide nanoparticles on endothelial cells by the intracellular pathway*. *Environ Toxicol*, 2018. **33**(12): p. 1221-1228.
93. Arias, L.S., et al., *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity*. *Antibiotics (Basel)*, 2018. **7**(2).
94. Ansari, M.O., et al., *Evaluation of DNA interaction, genotoxicity and oxidative stress induced by iron oxide nanoparticles both in vitro and in vivo: attenuation by thymoquinone*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 6912.
95. Jean Cornier, A.O., Arno Kwade, Marcel Van de Voorde, *Pharmaceutical Nanotechnology, 2 Volumes: Innovation and Production*. 2017, Germany: Wiley-VCH. 775.
96. Kalantari, H., *Nanotoxicology*. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 2013. **8**(1): p. 1-2.
97. Gupta, R. and H. Xie, *Nanoparticles in Daily Life: Applications, Toxicity and Regulations*. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2018. **37**(3): p. 209-230.
98. Schrand, A.M., et al., *Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2010. **2**(5): p. 544-68.
99. Wan, R., et al., *DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM*. *Chem Res Toxicol*, 2012. **25**(7): p. 1402-11.
100. Rim, K.T., S.W. Song, and H.Y. Kim, *Oxidative DNA damage from nanoparticle exposure and its application to workers' health: a literature review*. *Saf Health Work*, 2013. **4**(4): p. 177-86.