



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rita Margarida Pereira Ladeira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanotoxicologia: Uma Área Emergente” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. César Gonçalves e Dr. Ricardo Andrade, da Dra. Ana Paula Pipa e Dra. Diana Carolina e da Professora Doutora Ana Rita Figueiras a 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

Rita Margarida Pereira Ladeira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanotoxicologia: Uma Área Emergente” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. César Gonçalves e Dr. Ricardo Andrade, da Dra. Ana Paula Pipa e Dra. Diana Carolina e da Professora Doutora Ana Rita Figueiras e 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



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Rita Margarida Pereira Ladeira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014213947, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanotoxicologia: Uma Área Emergente” 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, 4 de setembro de 2019.

Rita Margarida Pereira Ladeira

(Rita Margarida Pereira Ladeira)

ÍNDICE

PARTE I – RELATÓRIOS DE ESTÁGIO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO: OWLPARMA CONSULTING, LDA.	2
Lista de Abreviaturas	3
Introdução	4
OWLpharma – Consulting, Lda.....	4
Análise SWOT.....	5
Pontos Fortes	5
1. Formações iniciais	5
2. Conhecimentos dos vários departamentos	6
3. Equipa jovem	7
4. Autonomia	7
Pontos Fracos.....	7
1. Volume de trabalho	7
2. Falta de <i>feedback</i> em algumas tarefas.....	8
3. Repartição do tempo entre os vários departamentos	8
Oportunidades	8
1. Estágio em AR.....	8
2. Desenvolvimento de competências na área.....	8
Ameaças.....	9
1. Não reconhecimento do estágio em AR.....	9
Considerações Finais.....	9
Referências Bibliográficas	9
RELATÓRIO DE ESTÁGIO: FARMÁCIA MOURO	10
Lista de Abreviaturas	11
Introdução	12
Farmácia Mouro	13

Análise SWOT.....	14
Pontos Fortes	14
2. Preparação de medicamentos manipulados	14
3. Unidade de Apoio ao Hipertenso (UAH).....	15
4. Integração na equipa.....	15
5. Repartição do estágio.....	15
Pontos Fracos.....	16
1. Carga horária	16
Oportunidades	16
1. Participação em ações de formação	16
2. Comunicação com os utentes.....	16
3. Aconselhamento.....	17
Ameaças.....	17
4. Aquisição de MSRM.....	17
5. Medicamentos de Venda Livre.....	17
Considerações Finais.....	18
Anexo	19
Referências Bibliográficas	19

PARTE 2 – MONOGRAFIA

NANOTOXICOLOGIA: UMA ÁREA EMERGENTE	20
Lista de Abreviaturas	21
Resumo	22
Abstract	23
Introdução.....	24
Fatores que afetam a toxicidade das Nanopartículas	25
Estudos <i>in vitro</i>	27
Ensaio com o MTT	28

Ensaio com o Vermelho Neutro.....	28
Citometria de Fluxo com o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)	29
Culturas celulares primárias.....	29
Linhas celulares	30
Estudos <i>in vivo</i>	30
Toxicidade pulmonar	32
Toxicidade Hepática	32
Toxicidade Renal	33
Toxicidade Esplénica.....	34
Farmacocinética das nanopartículas.....	34
Absorção	35
Distribuição.....	36
Metabolismo	37
Eliminação.....	37
Toxicologia de Nanossistemas	39
Lipossomas.....	40
Nanopartículas Metálicas	41
Nanopartículas Poliméricas	41
Micelas Poliméricas	42
Conclusão.....	43
Anexo.....	45
Referências Bibliográficas.....	48

PARTE I – RELATÓRIOS DE ESTÁGIO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO: OWLPHARMA
CONSULTING, LDA.**

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
AR	Assuntos Regulamentares
CSI	<i>Core Safety Information</i>
EAC	<i>English African Country</i>
CTD	<i>Common Technical Document</i>
EMA	Agência Europeia do Medicamento
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FI	Folheto Informativo
IPN	Instituto Pedro Nunes
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PhV	Farmacovigilância
QRD	<i>Quality Review of Documents</i>
RAM	Reação Adversa a um Medicamento
RCM	Resumo das Características do Medicamento
RPS	Relatórios Periódicos de Segurança
SWOT	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
XEVMPD	<i>Extended EudraVigilance Medicinal Product Dictionary</i>

INTRODUÇÃO

O presente relatório surge no âmbito da unidade curricular “Estágio” do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC).

Para além de podermos ingressar numa carreira de farmacêutico comunitário, existem outras opções nomeadamente em farmácia hospitalar, indústria farmacêutica, área regulamentar, análises clínicas, entre outras. A FFUC disponibiliza, em parceria com as diversas empresas do ramo e com as diferentes áreas de atuação em mente, outros estágios para os seus estudantes, para além do obrigatório em farmácia comunitária.

Sempre me interessei pela área regulamentar, graças ao Professor Doutor João José, responsável pela Unidade Curricular de “Assuntos Regulamentares”, lecionada no 4ºano, pelo que decidi candidatar-me a um estágio nesta mesma área, com o intuito de perceber a realidade do trabalho em Assuntos Regulamentares.

O estágio na Owlpharma decorreu entre os dias 3 de janeiro e 29 de março de 2019, sob a orientação dos dois Diretores, Dr. César Gonçalves e Dr. Ricardo Andrade.

Este relatório irá ser constituído por uma análise SWOT, com os Pontos Fortes (*Strengths*), Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*), com base na minha experiência pessoal na empresa durante os 3 meses enunciados.

OWLPHARMA – CONSULTING, LDA.

A Owlpharma – Consulting, Lda. é uma empresa de consultadoria na área farmacêutica, sediada em Coimbra. Tendo iniciado o seu percurso na incubadora de empresas do Instituto Pedro Nunes (IPN), caracteriza-se como uma empresa inovadora e direcionada para o cliente.

A empresa divide a sua ação em 4 áreas - Assuntos Regulamentares, Farmacovigilância, Garantia da Qualidade e *Medical Affairs* -, com profissionais devidamente qualificados em cada uma delas. A área de Assuntos Regulamentares (AR) tem como responsável a Dra. Ana Margarida Andrade, a de Farmacovigilância (PhV) conta com a supervisão do Dr. Ricardo Andrade e da Doutora Mariana Rocha, a Qualidade é assegurada pelo Dr. André Luz e os *Medical Affairs* pela Doutora Lúcia Ferreira^[1].

Durante o meu estágio tive oportunidade de realizar tarefas nas áreas de AR, PhV e *Medical Affairs*.

ANÁLISE SWOT



Pontos Fortes

1. Formações Iniciais

Aquando do início do estágio na Owlpharma, todos os estagiários têm uma série de formações iniciais, para uma melhor compreensão acerca do funcionamento da empresa, das áreas em que esta atua e atividades desempenhadas com mais frequência.

Tivemos então uma primeira formação de **AR**, com a Dra. Ana Margarida, em que nos foram explicados os pontos fulcrais dos AR, nomeadamente no que diz respeito às diversas *guidelines* existentes no *site* da Agência Europeia do Medicamento (EMA) (e que estão à nossa disposição para consulta), aos dossiers do medicamento no formato *Common Technical Document* (CTD), aos tipos de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e às renovações de AIM. Ainda dentro dos AR, foi-nos dada uma formação sobre “Informação do Produto”, pela Dra. Rita Agrela, que nos elucidou acerca dos diversos tipos de documentos com os quais nos podíamos deparar durante o estágio, tais como o Resumo das Características do Medicamento (RCM), o Folheto Informativo (FI) e a Rotulagem, enfatizando o facto de todos eles se regerem pelas características do *Quality Review of*

Documents (QRD). Para finalizar as formações de AR, o Dr. Frederico Nunes explicou-nos como é que se elabora uma comparação de *Core Safety Information* (CSI).

Na formação de **Farmacovigilância**, a Doutora Mariana Rocha deu-nos a conhecer os diferentes termos e tarefas relacionadas com esta área, dos quais se podem destacar os conceitos de Reação Adversa ao Medicamento (RAM), Pessoa Responsável de Farmacovigilância e os prazos que devem ser cumpridos para submeter uma RAM.

Mais no final do estágio, a Doutora Lígia Ferreira, da parte dos *Medical Affairs*, ensinou-nos a fazer Testes de Legibilidade, que se baseiam numa série de entrevistas a voluntários e têm como objetivo a aprovação de um FI. Foi-nos dada ainda a oportunidade de realizar um Teste de Legibilidade já depois de terminado o estágio na empresa.

2. Conhecimentos dos vários departamentos

I. Departamento de Medical Affairs

Durante o período de estágio foi possível conhecer um pouco do que era o departamento de *Medical Affairs*, realizando algumas tarefas com a Doutora Lígia Ferreira, entre as quais se pode destacar:

- Preenchimento de Relatórios Periódicos de Segurança (RPS);
- Pesquisas bibliográficas e verificação de bibliografias;
- Elaboração de um Módulo 5.2 de um *dossier*.

II. Departamento de PhV

No departamento de PhV, e à semelhança do que aconteceu com o de *Medical Affairs*, foi-me pedido para realizar algumas tarefas pontuais, como traduções de circulares. Mais tarde, tive ainda a oportunidade de ajudar na pesquisa nacional da literatura que é, a meu ver, um dos principais focos da PhV. Esta pesquisa consiste em avaliar, de forma crítica, os dados bibliográficos relativos a um conjunto de princípios ativos que saíram à data da revisão, e se esses mesmos são relevantes ao ponto de serem notificados como uma RAM. Este tipo de atividade fomenta verdadeiramente o espírito crítico da pessoa que a está a realizar, ajudando ainda na compreensão da estrutura de artigos científicos.

III. Departamento de AR

Neste departamento tive oportunidade de realizar as seguintes tarefas:

- Preparação de alterações aos termos de AIM (*Cover Letter* e Formulário);

- Correção e tradução de FI's, RCM's e rotulagem de acordo com o *template* QRD atualmente em vigor;
- Atualização de dados na plataforma *Extended EudraVigilance Medicinal Product Dictionary* (XEVMPPD);
- Comparação de CSI's;
- Preparação de Dossiers de medicamentos para registo em países africanos de língua inglesa, designados por formato EAC e preenchimento dos respetivos formulários (exigidos pelas autoridades locais).

3. Equipa jovem

A Owlpharma – Consulting, Lda., é composta por uma equipa bastante jovem sendo, sem dúvida, uma mais valia para todos os estagiários que por lá passem. Uma equipa jovem e motivada para as suas tarefas inspira qualquer recém-chegado a seguir os mesmos exemplos.

4. Autonomia

Apesar de todos os nossos trabalhos serem mais tarde revistos por alguém experiente, sempre nos foi dada muita autonomia na realização das tarefas propostas. Antes de cada tarefa nova eram-nos dadas algumas orientações, sempre com a possibilidade de esclarecermos dúvidas, caso fosse necessário. No entanto, o sentido de autonomia e independência foi sempre muito fomentado, sendo uma mais-valia no desenvolvimento de qualquer profissional.

Pontos Fracos

I. Volume de trabalho

Tal como acontece em qualquer empresa, existiram períodos de grande afluência de trabalho, contrastando com outros momentos mais parados e monótonos. Houve algumas ocasiões em que não tinha tarefas para realizar em nenhum departamento, o que considero um ponto fraco na perspetiva da minha aprendizagem na empresa. No entanto, foi-me sempre dada a liberdade para aproveitar esse tempo da melhor forma, inclusive para adiantar os projetos académicos que tinha em mãos.

2. Falta de *feedback* em algumas tarefas

Algumas vezes, e apesar de ter sempre um esclarecimento inicial sobre o que iria desenvolver, senti que não houve um *feedback* final relativamente ao trabalho desempenhado. Isto torna-se um ponto fraco uma vez que, não sabendo quais os pontos em que errei, caso voltasse a desempenhar a mesma tarefa iria cometer as mesmas falhas, sendo, por isso, muito menos produtiva.

Tenho, no entanto, a noção que esta falta de *feedback* se devia ao volume de trabalho e aos prazos apertados da equipa e não por falta de apoio aos estagiários.

3. Repartição do tempo entre os vários departamentos

Cada estagiário vai ajudando nas tarefas dos departamentos conforme as necessidades. O departamento de AR apresenta geralmente um grande volume de trabalhos, o que fez com que grande parte do meu estágio fosse direcionado para essas questões. Apesar de ter sido uma mais-valia, porque ganhei imensa destreza na realização dos trabalhos que me eram solicitados em AR, sinto que o tempo despendido em cada departamento deveria ter sido mais uniforme, de modo a ter uma experiência igualmente enriquecedora nos restantes departamentos, nomeadamente na área da Qualidade, para o qual, infelizmente, não tive oportunidade de trabalhar.

Oportunidades

1. Estágio em AR

O facto de ter tido a oportunidade de realizar um estágio na área dos AR distingue-me da grande massa de alunos que passam apenas por Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar. Este estágio, bem como qualquer outro na área da Indústria Farmacêutica, permite uma visão alargada dos setores farmacêuticos, possibilitando decisões mais bem fundamentadas acerca do percurso que quero para o meu futuro.

2. Desenvolvimento de competências na área

Apesar de a Unidade Curricular de AR nos dar bases sólidas para um futuro trabalho na área, é extremamente importante para um aluno com este tipo de ambições passar por um estágio numa empresa como a Owlpharma – Consulting, Lda. É neste contexto que

aprendemos - praticando, errando e corrigindo - , permitindo-nos construir uma base sólida a partir da qual podemos crescer.

Ameaças

I. Não reconhecimento do estágio em AR

O estágio em AR, à semelhança do que acontece com todos os estágios em Indústria Farmacêutica, não é reconhecido. Desta forma, os alunos que decidam realizar um estágio nesta área têm de fazer 810 horas de estágio em Farmácia Comunitária, em contraste com as 610 horas exigidas a um estudante que decida fazer estágio em Farmácia Hospitalar.

É-nos dada a hipótese de descontar as 170 horas de um estágio de verão realizado após a conclusão do 3º ano, diminuindo a carga horária para 670 horas. Esta redução de horas, que nos é possibilitada pela FFUC, permite que alunos que gostavam de experimentar outras áreas das Ciências Farmacêuticas, o possam efetivamente fazer, como é o meu caso. No entanto, permanece a diferença de cargas horárias entre os vários estágios.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na globalidade, considero o meu pequeno percurso na Owlpharma – Consulting, Lda. uma experiência enriquecedora não só a nível pessoal, pelas pessoas com quem tive oportunidade de me cruzar, mas também a nível académico, por tudo o que aprendi.

Este estágio possibilitou-me o desenvolvimento de algumas *soft skills* como espírito crítico, metodologia de trabalho e gestão de tempo, que irão certamente acompanhar-me durante a minha vida profissional, seja ela em que ramo for.

Resta-me, por isso, agradecer à FFUC e a toda a equipa da Owlpharma – Consulting, Lda., especialmente ao Dr. César Gonçalves e ao Dr. Ricardo Andrade pela oportunidade que me deram.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I- Owlpharma – Owlpharma Consulting. Disponível em: <http://www.owlpharma.pt/>. (Consultado a 22 de julho de 2019)

RELATÓRIO DE ESTÁGIO: FARMÁCIA MOURO

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Assuntos Regulamentares
BZD	Benzodiazepinas
DT	Diretor(a) Técnico(a)
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MSRM	Medicamento Sujeito a Receita Médica
PA	Pressão Arterial
SWOT	<i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
UAH	Unidade de Apoio ao Hipertenso

INTRODUÇÃO

Ao chegar ao último ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), os alunos devem escolher onde querem realizar os seus estágios.

O estágio curricular em Farmácia Comunitária é fundamental para que haja um primeiro contacto com aquela que é a realidade profissional da maioria dos farmacêuticos. É na farmácia que podemos pôr em prática muitos dos conhecimentos que fomos adquirindo ao longo do curso. Para além disso, é um teste constante às capacidades de comunicação, organização, trabalho em equipa e resolução de problemas.

Escolhi a Farmácia Mouro em Viseu para a realização do meu estágio não só pelo *feedback* de outros colegas mais velhos, mas também por ser uma farmácia grande e com uma boa localização na cidade.

O presente relatório surge no âmbito do meu estágio na referida farmácia, contando com a orientação da Diretora Técnica (DT), Dra. Ana Paula Pipa e da Dra. Diana Carolina, e decorreu entre os dias 1 de abril e 19 de julho de 2019. Irá ser constituído por uma análise SWOT, com os Pontos Fortes (*Strenghts*), Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*), com base na minha experiência pessoal durante este período.

FARMÁCIA MOURO

A Farmácia Mouro está inserida num grupo de 4 farmácias situadas na zona de Viseu e da Guarda. Sob a Direção Técnica da Dra. Ana Paula Pipa, a farmácia é constituída por uma equipa diversificada de farmacêuticos, técnicos e auxiliares de farmácia, todos motivados e empenhados num objetivo comum: proporcionar o melhor serviço ao utente.

No primeiro piso da farmácia situa-se a sala de atendimento, com 6 balcões de atendimento individualizado, onde se preza a privacidade de cada utente. A sala está ainda dividida em várias zonas como a podologia, os bucodentários, a ortopedia, a cosmética ou a puericultura.

No piso inferior situa-se o armazém. É nesta zona que se faz a gestão do *stock* da farmácia e é da responsabilidade do Bruno e do Ricardo, técnicos auxiliares de farmácia, as primeiras pessoas com quem contactei, uma vez que todos os estagiários iniciam o seu percurso no armazém.

Acima da zona de atendimento existem duas salas destinadas a consultas semanais de nutrição e podologia, um gabinete de utente, para a realização de testes bioquímicos (colesterol, triglicéridos, glicémia) e avaliação da pressão arterial (PA), o laboratório, para a preparação de manipulados, uma prática recorrente nesta farmácia, um WC e o gabinete da DT.

Acima destas salas, existe ainda um pequeno espaço reservado para os colaboradores, com zonas de arrumação.

ANÁLISE SWOT



Pontos Fortes

1. Preparação de medicamentos manipulados

A Farmácia Mouro tem ao seu dispor um laboratório muito completo para preparação de medicamentos manipulados. Foram muitos os manipulados que tive oportunidade de preparar, desde a clássica suspensão de trimetoprim, a carteiras destinadas a uso pediátrico, passando ainda pelos cremes para infeções dermatológicas e podologia.

De facto, considerava que a preparação de medicamentos manipulados estava a cair em desuso, pelo que me surpreendeu imenso o número de preparações com que me deparei durante o estágio. A sua preparação, nesta farmácia, está ao encargo da Dra. Ana Lúcia que, sempre que surgia a oportunidade, nos chamava para ajudarmos.

Considero, sem dúvida, um ponto forte, uma vez que me permitiu rever alguns conceitos adquiridos em anos anteriores, mas também perceber que a manipulação de medicamentos é, ainda, uma realidade bastante presente e com evidente potencial de crescimento.

2. Unidade de Apoio ao Hipertenso (UAH)

A farmácia dispõe de uma UAH, que consiste num serviço de monitorização da PA através do aparelho OMRON 907, pretendendo-se com isto eliminar o “efeito da bata branca”^[1]. Este dispositivo faz medições totalmente automáticas da PA, sendo que o utente fica sozinho na sala durante cerca de 15 minutos. Numa primeira fase, o aparelho apenas conta cinco minutos sem elaborar qualquer operação, para assegurar que o utente descansa antes da medição. Posteriormente, são feitas 3 medições consecutivas da PA e é gerada uma média, cujo valor aparece ao profissional de saúde no ecrã do aparelho. Passados os 15 minutos, o profissional de saúde volta ao gabinete e anota os valores mostrados.

Em Viseu, a Farmácia Mouró é uma das duas farmácias que dispõe deste serviço, pelo que muitos utentes foram encaminhados até lá, a fim de monitorizarem os seus valores de PA, na grande maioria das vezes após terem iniciado uma nova terapêutica para tal.

Considero este um ponto forte pois, para além de me ter introduzido um método sobre o qual não tinha conhecimento, possibilitou-me ainda o acompanhamento de alguns utentes regulares, que se dirigiam à farmácia para estas avaliações.

3. Integração na equipa

Qualquer que seja a empresa ou área de atuação, a existência de uma equipa forte, coesa e unida é meio caminho para que se atinjam bons resultados, e é isso que acontece na Farmácia Mouró, muito devido ao trabalho da Dra. Ana Paula. Equipas fortes avançam num objetivo comum e têm uma melhor capacidade de integração de novos elementos. Sempre me senti integrada na equipa desde o primeiro dia, tendo sido um ponto muito positivo para o meu percurso e aprendizagem.

4. Repartição do estágio

Qualquer estudante de Ciências Farmacêuticas que inicie o seu estágio numa farmácia deve ter uma noção prática das várias zonas que a constituem. Por isto, o meu estágio iniciou-se no armazém, onde aprendi a rececionar encomendas e a arrumar medicamentos. Mais tarde passei para o receituário, onde tive oportunidade de rever conceitos acerca das diferentes tipologias de receitas e aprendi os vários regimes de complementaridade. Só depois de ter todo este *background* é que passei para a sala de atendimento, inicialmente acompanhada pela minha orientadora, a Dra. Diana Carolina e, mais tarde, sozinha.

A primeira fase, no armazém, serviu não só para perceber como este funciona, mas também para ir contactando com os vários produtos que entram na farmácia, para além dos

Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM). Isto permitiu-me uma evolução gradual, preparando-me melhor para a fase do aconselhamento.

Por tudo isto, considero que a forma como o meu estágio foi organizado me proporcionou uma aprendizagem faseada o que é, certamente, um ponto forte a reter.

Pontos Fracos

1. Carga horária

Como o meu estágio anterior foi em Assuntos Regulamentares (AR), tive de completar 670 horas de estágio na farmácia, com uma carga horária diária de 8,5 horas. Ao se aproximar o final do estágio, senti que esta carga horária já pesava, em consequência de algum cansaço acumulado.

Oportunidades

1. Participação em ações de formação

Durante estes 4 meses tive oportunidade de participar em algumas ações de formação proporcionadas na própria farmácia pelos delegados de marcas como Colgate®, Aboca®, Absorvit®, Darphin® e Seresto®. Nestas pequenas formações eram focadas não só as suas características principais, como também a melhor forma de aconselhamento, constituindo uma ótima oportunidade para conhecer alguns produtos e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (NSRM) que podem ser um bom complemento ao tratamento aconselhado pelo médico.

2. Comunicação com os utentes

O atendimento e a comunicação com os utentes são de extrema importância, não só pelo desenvolvimento de novas capacidades de lidar com diferentes tipos de pessoas e situações, mas também para aprendermos a ouvir e a perceber as necessidades das pessoas. Lidar com o público nem sempre é tarefa fácil, mas é, sem dúvida, muito gratificante na maioria das vezes.

Durante o meu percurso na farmácia tive a oportunidade de atender todo o tipo de pessoas, de diferentes idades e com diferentes tipos de necessidades, o que considero ter sido uma boa oportunidade para o meu desenvolvimento.

3. Aconselhamento

Um pouco no seguimento do ponto anterior, o contacto com o público possibilitou um melhor aconselhamento ao utente. Não são raras as vezes em que as pessoas chegam à farmácia com ideias pré-concebidas de medicamentos para o sintoma que têm. Cabe ao farmacêutico, enquanto profissional, “desmontar” estas crenças, perceber o que o utente realmente revela e, posteriormente, aconselhar da melhor forma possível. Este aconselhamento pode inclusive passar por não aconselhar nenhum produto ou reencaminhar para o médico.

Ter a oportunidade de aconselhar um doente é uma excelente oportunidade para a nossa evolução enquanto futuros farmacêuticos. Em anexo, encontra-se um exemplo prático de uma destas situações.

Ameaças

1. Aquisição de MSRM

Uma ameaça com que me deparei ao longo do estágio e que será possivelmente uma das maiores dificuldades numa farmácia, é a tentativa constante de aquisição de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica, nomeadamente antibióticos, antidepressivos e benzodiazepinas (BZD).

Muitos utentes têm ainda a ideia errada de que uma constipação se resolve com um antibiótico. Deparei-me, frequentemente, com pessoas jovens completamente dependentes da BZD e do antidepressivo para dormir. Esta realidade foi uma ameaça para mim, como será certamente para todos os farmacêuticos comunitários. A culpa da não cedência dos medicamentos é sempre atribuída ao farmacêutico que está a fazer o atendimento e à farmácia em questão. São situações que, por vezes, são difíceis de lidar pois os utentes ficam bastante chateados e acabam por ir a outra farmácia para tentarem adquirir o mesmo produto.

2. Medicamentos de Venda Livre

A questão acima mencionada pode ser colmatada com um bom aconselhamento de MNSRM. No entanto, nessa situação, deparei-me com uma nova ameaça: existem muitos medicamentos deste género para atenuar e tratar diferentes sintomas. É preciso que nós, enquanto estagiários, dediquemos algum do nosso tempo a tentar perceber todos os

produtos disponíveis na farmácia. Se não soubermos qual é a alternativa que podemos dar à pessoa que pede um antibiótico ou uma BZD, podemos cair na tentação de ceder um medicamento que não estamos autorizados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Passados estes 4 meses, considero que a minha experiência na Farmácia Mouro foi muito enriquecedora. Para além de ter gostado de trabalhar diretamente com o público, deparei-me com uma equipa jovem, motivada e positiva, sentindo-me sempre incluída, mesmo quando algo corria menos bem.

Resta-me, por isso, agradecer a todos pela experiência que me proporcionaram: à Dra. Paula, à Dra. Diana Carolina, à Dra. Ana Lúcia, à Dra. Zélia, à Dra. Graciete, à Dra. Andreia, à Dra. Catarina, à Patrícia, à Gabriela, ao Bruno, ao Ricardo, à Natalhie e ao Sr. Adílio,

O meu muito obrigada por tudo!

ANEXO

Caso Clínico

O utente chega à farmácia e pede Serenal[®], uma BZD sem a qual não consegue dormir. Não traz qualquer tipo de receita.

A primeira abordagem passa sempre por tentar perceber para que finalidade é que a pessoa quer o medicamento. Após alguma conversa, percebo que o utente quer tentar adquirir a BZD mesmo contra a vontade do médico, que não lhe renovou a receita para tal. Depois de perceber a situação, tentei explicar ao utente que as BZD não se devem utilizar de forma aleatória, pois têm alguns efeitos secundários associados, para além de causarem dependência. Existem, no entanto, outros medicamentos que, ao conterem melatonina e valeriana, ajudam a regular o ciclo circadiano de forma natural e sem causarem habituação. Nestas situações é importante referir que o efeito destas alternativas não é como o das BZD e que requer pelo menos 2 semanas de toma. Assim, o utente já está a contar que o efeito não seja imediato e não fica tão ansioso pelo resultado.

Após a minha explicação, o utente acabou por levar o *Advancis[®] Passival[®] Sono*, um suplemento alimentar à base de melatonina e valeriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I. Perox Pharma: Unidade de Apoio ao Hipertenso. Disponível em: <https://perox.updatemedicina.com/> (Consultado a 24 de julho de 2019)

PARTE 2 – MONOGRAFIA

NANOTOXICOLOGIA: UMA ÁREA EMERGENTE

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAT	Catalase
CMC	Concentração Micelar Crítica
DCFH-DA	Diacetato de Diclorofluoresceína
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i>
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
IFN	Interferão
IL	Interleucina
LDH	Lactato Desidrogenase
MTT	Metil-Tiazolil-Tetrazólio
NF	Neutropenia Febril
NP	Nanopartícula
PBPK	<i>Physiologically based pharmacokinetic modelling</i> (modelos farmacocinéticos de base fisiológica)
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Ácido Poli(láctico co-glicólico)
PTX	Paclitaxel
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
TNF	Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

A nanotecnologia, onde se inserem as NPs, é uma das áreas mais importantes no desenvolvimento da Indústria Farmacêutica.

Sendo as NPs pequenos transportadores onde pelo menos uma das dimensões físicas se encontra entre 1-100 nm, estas contribuem para uma melhoria das características biofarmacêuticas dos princípios ativos.

Diversos fatores contribuem para a toxicidade de uma NP, de onde se pode destacar, sem dúvida, a dose administrada, mas também o tamanho e área de superfície, as características da superfície, a estabilidade e a via de exposição.

Para que se possa avaliar adequadamente o comportamento das NPs, podem ser realizados estudos *in vitro*, em culturas celulares, ou *in vivo*, em animais. Numa situação ideal, apenas seriam utilizadas as culturas celulares, por todas as questões éticas e morais associadas ao uso de animais. No entanto, atualmente, esta situação não se verifica, pois ainda não se estabeleceu uma correlação *in vivo/in vitro* adequada.

O comportamento das NPs acima mencionado corresponde às suas características farmacocinéticas, no que diz respeito à Absorção, Metabolização, Distribuição e Eliminação. Se se entender como é que a partícula se comporta dentro do organismo, e em contacto com os vários fluidos, a compreensão dos seus mecanismos de toxicidade é simplificada.

Para finalizar, serão apresentados exemplos práticos de toxicidade de medicamentos já comercializados com lipossomas, NPs poliméricas e metálicas e micelas poliméricas. O efeito secundário mais comum é, de facto, as reações de hipersensibilidade, que podem e devem ser prevenidas com a utilização de anti-histamínicos.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Nanotoxicologia, Nanopartícula, Toxicidade, In vivo, In vitro, ADME, Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação, Lipossoma, AmBisome, Anfotericina B, Nanopartícula Metálica, Feraheme, Nanopartícula Polimérica, Neulasta, Filgastrim, Micela Polimérica, Taxol, Paclitaxel.

ABSTRACT

Nanotechnology, where NPs can be put in, is one of the most important areas in the development of the Pharmaceutical Industry.

As NPs are characterized as small transporters in which, at least, one of the physical dimensions is between 1-100 nm, they certainly lead to an improvement in the biopharmaceutical characteristics of the active ingredients.

Many factors can contribute the toxicity of a NP. The dose is undoubtedly the most important one, but we can also mention others like the size and the surface area, surface characteristics, stability and route of exposure.

To better assess the behaviour of a NP, two types of studies can be implemented – the *in vitro* studies, with cellular cultures, or the *in vivo* studies, with animals. Ideally, only cellular cultures should be used, because of the moral and ethics issues associated to the animal use in such studies. However, nowadays, that does not happen, as an adequate *in vivo/in vitro* correlation has not been established yet.

The above-mentioned behaviour of the NPs is no more than their pharmacokinetic characteristics regarding Absorption, Metabolism, Distribution and Elimination. If we comprehend how a NP behaves inside the organism, and in contact with the various biological fluids, the understanding of its toxicity mechanisms is simplified.

Finally, several practical examples of the toxicity of already commercialized medicines with liposomes, polymeric and metallic NPs and polymeric micelles are presented. The most commonly reported adverse effect is hypersensitivity reactions, which can and should be prevented with the use of antihistamines.

Keywords: Nanotechnology, Nanotoxicology, Nanoparticle, Toxicity, In vivo, In vitro, ADME, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Liposome, AmBisome, Amphotericin B, Metallic Nanoparticle, Feraheme, Polymeric Nanoparticle, Neulasta, Filgastrim, Polymeric Micelle, Taxol, Paclitaxel.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma das áreas mais importantes do desenvolvimento industrial do século XXI e tem os seus pilares na pesquisa e no desenvolvimento de sistemas, recorrendo a técnicas que permitam a organização dos materiais em escalas nanométricas (*Dalgleish et al., 2011*).

As nanopartículas (NPs) são nanomateriais em que pelo menos uma das três dimensões físicas se encontra entre 1-100 nm (*Dalgleish et al., 2011*). A sua aplicação está distribuída pelas mais diversas áreas, desde a cosmética à indústria têxtil, sendo o seu principal campo de aplicação a indústria farmacêutica. Dentro desta, estes nanomateriais contribuem para a melhoria das características biofarmacêuticas dos princípios ativos, permitindo atingir alvos terapêuticos específicos e até controlar perfis de libertação (*Saifi, Khan e Godugu, 2018; Wu e Tang, 2018*).

Podem ser utilizados diversos materiais no fabrico destas partículas nanométricas, nomeadamente o carbono, alguns metais e respetivos óxidos, polímeros e materiais semicondutores (*Saifi, Khan e Godugu, 2018; Wu e Tang, 2018*).

Considerando a imensidade de campos de aplicação das NPs assim como o elevado número de materiais que podem ser incluídos nestas, é imperativo o estudo dos mecanismos toxicológicos que lhes são inerentes, bem como a sua interação com o corpo humano. A nanotoxicologia é, portanto, o ramo da toxicologia que avalia o perfil toxicológico das nanopartículas nos organismos e nos ecossistemas, estudando os mecanismos de toxicidade e citotoxicidade das partículas nestes (*Saifi, Khan e Godugu, 2018; Wu e Tang, 2018*).

Há muitos fatores que contribuem para o perfil toxicológico de uma NP. Entre eles podem-se destacar o tamanho e área de superfície e a via pela qual houve exposição. O tamanho e a sua área de superfície são as duas características mais determinantes do ponto de vista toxicológico, sendo que quanto menor for o tamanho da NP, maior a sua área de superfície e, portanto, maior a reatividade com os tecidos. Quanto à via de exposição, a inalatória é considerada a mais comum (*Saifi, Khan e Godugu, 2018; Wu e Tang, 2018*).

Os mecanismos de toxicidade destes nanomateriais ainda não se encontram bem conhecidos e identificados. Contudo, estudos em modelos animais sugerem que estes podem estar relacionados com a acumulação nos tecidos e posterior aumento do stress oxidativo, pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (*Saifi, Khan e Godugu, 2018; Wu e Tang, 2018*).

Esta monografia pretende reunir e clarificar a toxicidade de um conjunto de nanopartículas nos tecidos, avaliando os estudos *in vitro* e *in vivo* existentes, as relações que

se podem estabelecer entre estes e a transposição para o ser humano. Para tal é essencial conhecer os diferentes modelos celulares e animais mais usados nestas pesquisas e perceber todo o percurso destas partículas até serem eliminadas, através do conhecimento da sua farmacocinética de Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (ADME).

FATORES QUE AFETAM A TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As NPs são cada vez mais utilizadas como alternativas eficazes por parte da indústria farmacêutica. Este crescente interesse na sua utilização levou também a um maior investimento no estudo dos efeitos nocivos que daí podem advir (*Azhdarzadeh et al., 2015*).

Para entender de que forma as NPs podem induzir toxicidade nos tecidos, é importante perceber quais as características que mais contribuem para tal. Entendendo estes mecanismos é possível, numa fase posterior, adaptar essas características de forma a que estas induzam a menor toxicidade possível nos organismos.

As NPs são materiais muito complexos que se comportam de formas bastante dispares em função do ambiente físico-químico em que estão inseridas. No entanto, há um conjunto de características que devem ser tidas em consideração aquando do estudo da nanotoxicidade, como o **tamanho e a área de superfície**, as **caraterísticas de superfície**, a **estabilidade** da partícula, a presença de **impurezas** e a **via** pela qual ocorreu a exposição (*Saifi, Khan e Godugu, 2018*). Destas, o tamanho e a área de superfície são as características que mais contribuem para o perfil toxicológico, no entanto, todas elas estão dependentes de um fator que se lhes sobrepõe: a dose administrada (*Saifi, Khan e Godugu, 2018; Talkar et al., 2018*).

A reduzida compreensão destes fatores e da interação das NPs com o organismo leva a que as correlações que se estabelecem apenas com base nestas características tenham um baixo valor preditivo, devendo ser sempre complementadas com ensaios toxicológicos mais específicos (*Azhdarzadeh et al., 2015*).

O **tamanho e a área de superfície** são dois parâmetros que se relacionam e que variam de forma inversamente proporcional. Quanto menor for o tamanho, maior área de superfície em contacto com o meio, o que resulta, em última análise, numa maior reatividade tanto intra como extracelular (*Saifi, Khan e Godugu, 2018*). NPs de menores dimensões, tendo uma maior área de superfície, induzem maiores níveis de oxidação e de citotoxicidade

(Ajdary et al., 2018). Para além disso, partículas de tamanho mais reduzido conseguem atingir locais do organismo que, caso contrário, seriam inacessíveis (Adabi et al., 2016).

Relativamente às **caraterísticas da superfície**, podem ser destacadas duas principais: a carga de superfície e a presença, ou não, de uma “coroa proteica” (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

As NPs podem ter carga positiva, negativa ou neutra. A fim de perceber a forma como a carga de superfície pode estar na origem da toxicidade, é importante interiorizar que a membrana celular dos mamíferos tem carga de superfície negativa. Por conseguinte, as partículas catiónicas são mais rapidamente reconhecidas como corpos estranhos (dada a sua diferença na composição) levando a uma maior ativação do sistema imunitário (Adabi et al., 2016). Por outro lado, as partículas aniónicas entram mais facilmente para o meio intracelular, uma vez que a sua composição de superfície é semelhante à das células, induzindo toxicidade ao nível do DNA (Ajdary et al., 2018). Podemos então concluir que NPs catiónicas induzem uma maior resposta por parte do sistema imunitário, com libertação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, enquanto que as aniónicas são reconhecidas pela sua citotoxicidade (Saifi, Khan e Godugu, 2018; Talkar et al., 2018).

A “coroa proteica” consiste na adsorção de proteínas à superfície das NPs. Este fenómeno ocorre em maior extensão para partículas de elevada carga, sejam elas positivas ou negativas. As NPs envolvidas por coroa proteica induzem uma maior resposta imunitária, já que as proteínas séricas e plasmáticas aumentam a absorção fagocitária (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

Também a **estabilidade** pode estar na origem da toxicidade. NPs quimicamente estáveis, como é o caso dos metais nobres, não estão tão associadas a incidentes quando comparadas a outros compostos mais reativos. Partículas mais reativas, como é o caso das de carbono e de óxidos de metais, têm uma maior tendência a formar aglomerados, tornando-as ainda mais reativas e tóxicas (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

O mesmo se passa com a presença de **impurezas**. NPs impuras induzem uma maior ativação do sistema imunitário em comparação com as mesmas NPs purificadas (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

A **via de exposição à NP** também é um fator de extrema importância dada a influência direta que tem na dose de partícula que entra na corrente sanguínea. A via pulmonar é a via de exposição mais comum, mas na grande maioria das vezes a NP não chega à corrente sanguínea, resultando apenas numa interação local. Pelo contrário, a via sistémica resulta numa interação generalizada onde a partícula pode facilmente atingir órgãos principais

responsáveis pelo metabolismo, como o fígado, os rins ou o baço (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

ESTUDOS *IN VITRO*

A expressão “*in vitro*”, que significa “num frasco de vidro”, é amplamente utilizada quando nos referimos a estudos e ensaios laboratoriais, que ocorrem fora do organismo, geralmente numa cultura de células.

O uso de ensaios *in vitro* para a realização de um estudo de nanotoxicidade tem vantagens associadas, em comparação com os ensaios *in vivo*. As principais vantagens para os investigadores são, sem dúvida, a eliminação das variáveis intrínsecas aos organismos quando expostos a condições de *stress*, tendo o controlo absoluto do meio em que decorre o ensaio, desde as suas características físico-químicas (pH, temperatura) até às características fisiológicas, como a concentração de hormonas ou de nutrientes. A eliminação de todas estas variáveis assegura a obtenção de resultados mais reprodutíveis (Durán, Guterres e Alves, 2014). Para além disso, tanto a nível moral como ético, a utilização de culturas celulares é melhor aceite, não havendo a necessidade de expor animais a compostos potencialmente tóxicos (Saifi, Khan e Godugu, 2018). Por fim, é ainda importante referir as vantagens económicas deste tipo de testes, uma vez que, para além de proporcionarem resultados mais rápidos, exigem a utilização de menores volumes (de meios ou dos próprios compostos em estudo), contribuindo para um processo menos dispendioso (Durán, Guterres e Alves, 2014; Saifi, Khan e Godugu, 2018).

Existem diversos tipos de ensaios que podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade das NPs. Entenda-se por citotoxicidade o conjunto de efeitos adversos que resultam da interação da célula com algo externo, neste caso uma NP. Estes efeitos podem, por sua vez, interferir com a viabilidade da célula e conduzir mesmo à ativação de mecanismos de morte celular. É importante referir que nem todos os compostos tóxicos induzem mecanismos que culminam na morte da célula, sendo que muitas vezes há apenas alterações a nível da sua viabilidade (Durán, Guterres e Alves, 2014).

Por conseguinte, muitos ensaios centram-se na avaliação direta ou indireta da viabilidade celular, ou seja, têm como finalidade a quantificação da percentagem de células viáveis após a exposição de toda a cultura celular aos compostos em estudo (Durán, Guterres e Alves, 2014).

O ensaio com o Brometo de Metil-Tiazolil-Tetrazólio (MTT), com o corante Vermelho Neutro ou com Diacetato de Diclorofluoresceína são alguns exemplos destes testes.

Ensaio com o MTT

Este ensaio utiliza como reagente um sal tetrazólico, o brometo de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT). O ensaio MTT é dos mais utilizados para avaliar a viabilidade celular eucariótica e bacteriana. Neste procedimento colorimétrico, os sais tetrazólicos são reduzidos a cristais de formazano, que têm cor roxa característica e podem ser posteriormente quantificados por absorvância (Saifi, Khan e Godugu, 2018; Stockert et al., 2018). Esta redução é catalisada por desidrogenases e coenzimas intracelulares, entre as quais o NADPH, e é possibilitada pelo facto de o MTT ser um composto lipofílico que atravessa a membrana de células intatas. Desta forma, quanto maior for o número de células viáveis na cultura, maior será a quantidade de cristais formada e, conseqüentemente, maior a absorvância medida. Assim, quanto mais tóxica for uma NP para uma determinada cultura celular, menor será a absorvância medida no final do ensaio (Stockert et al., 2018). Quando aplicado à avaliação de NPs, este ensaio pode ter como desvantagem a absorção de cristais de formazano por estas, conduzindo a falsos positivos (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

Ensaio com o Vermelho Neutro

Este ensaio também avalia a viabilidade de culturas celulares, utilizando como reagente um corante e indicador de pH, do tipo eurodina, designado de Vermelho Neutro, que atravessa a membrana das células saudáveis, por difusão e que é, posteriormente, armazenado nos lisossomas. É possível quantificar o corante incorporado por espectrofotometria recorrendo a uma curva de dose resposta elaborada a partir de padrões (Ates et al., 2017; Saifi, Khan e Godugu, 2018). Como indicador de pH, o vermelho neutro apresenta-se amarelo para valores superiores a 8, contrastando com a cor vermelha em meios acídicos, como o meio lisossomal (Ates et al., 2017).

A interação das células com compostos potencialmente tóxicos altera as características das membranas celulares e lisossomais, resultando numa menor incorporação do corante. Desta forma, quanto maior for a absorvância medida no espectrofotómetro, maior terá sido a incorporação do corante e, portanto, menos tóxico o composto em análise. Pelo contrário, valores de absorvância mais reduzidos estão relacionados com toxicidade superior (Ates et al., 2017).

Citometria de Fluxo com o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

Este método é utilizado para medir o *stress* oxidativo da célula provocado pelas ROS (Jemaà *et al.*, 2017; Saifi, Khan e Godugu, 2018). Estas são naturalmente formadas no meio celular, sendo posteriormente eliminadas por mecanismos apropriados. Quando é ativado algum tipo de mecanismo de defesa intracelular, por exemplo em consequência da exposição das células a partículas tóxicas, este equilíbrio é posto em causa, resultando num aumento de ROS (Sena *et al.*, 2018). Desta forma, quanto maior for a toxicidade do composto em estudo, maior a quantidade de ROS formadas dentro da célula. Para avaliar este aumento é utilizado o diacetato de diclorofluoresceína, uma sonda química que adquire fluorescência na presença de ROS. Esta sonda é posteriormente quantificada num aparelho adequado, sendo que quanto maior o número de partículas de DCFH-DA, maior terá sido a toxicidade à qual a célula esteve exposta (Jemaà *et al.*, 2017; Oparka *et al.*, 2016).

De uma forma geral, os ensaios não estão desenvolvidos para o estudo de NPs, podendo haver ainda algumas lacunas, pelo que estes testes deveriam ser adaptados para a nanotoxicologia num futuro próximo, para que se assegurasse uma correlação *in vivo/in vitro* mais sólida e consistente (Durán, Guterres e Alves, 2014).

A escolha do tipo de cultura celular que será alvo de ensaio deve ser criteriosa, uma vez que diferentes culturas possuem diferentes características que podem interferir com os resultados do teste. É assim de extrema importância perceber as vantagens e desvantagens de cada modelo celular, para que sejam obtidos os melhores resultados (Durán, Guterres e Alves, 2014).

Existem dois modelos de culturas celulares: as culturas celulares primárias e as linhas celulares (ECACC, 2011).

Culturas celulares primárias

Como o próprio nome indica, as culturas celulares primárias são obtidas diretamente a partir dos tecidos dadores (animais ou humanos). A principal vantagem da utilização destas culturas prende-se com o facto de estas manterem as características morfológicas do tecido de onde provêm (Durán, Guterres e Alves, 2014). No entanto, para além de serem mais dispendiosas e difíceis de obter, são culturas muito instáveis e com tempo de vida finito, o que torna os resultados obtidos mais difíceis de reproduzir (ECACC, 2011).

Vários investigadores recorrem a culturas primárias para avaliarem a citotoxicidade das NPs que estudam. Um exemplo disso é Kim *et al.*, que avaliou a toxicidade pulmonar de NPs de zinco numa cultura primária de células epiteliais de rato (Durán, Guterres e Alves, 2014).

Linhas celulares

A partir do momento em que uma cultura celular primária é sujeita a alguma alteração, como o subcultivo, passa a ser designada de linha celular (Durán, Guterres e Alves, 2014).

As linhas celulares são culturas muito mais estáveis e têm como vantagem uma capacidade de replicação ilimitada, razões que levam a que sejam mais vezes escolhidas. No entanto, as suas características não são tão semelhantes às dos tecidos *in vivo*, como acontece com as culturas primárias (ECACC, 2011).

Na tabela seguinte está sumariada a informação relativa a linhas celulares usadas na avaliação da nanotoxicidade de partículas.

Tabela 1: Linhas celulares usadas em Nanotoxicologia

Fonte	Espécie	Tecido	Tipo de célula	Nome da linha celular
Kroll et al., 2011	Rato	Pulmão	Células epiteliais	RLE-6TN
	Murganho	Embrionário	Fibroblastos	NIH-3T3
	Murganho	Sangue	Macrófagos	RAW264.7
	Cão	Renal	Células epiteliais	MDCK
	Rato			MDCK II
Pujalté et al., 2011	Humano	Renal	Células mesangiais	IP15
			Células epiteliais	HK-2
Lanone et al., 2009	Humano	Pulmão	Células epiteliais	A549
		Sangue	Monócitos	THP-1
Lanone et al., 2009; Sayes, Reed e Warheit, 2007	Rato	Pulmão	Células epiteliais	L2

ESTUDOS IN VIVO

A expressão *in vivo* deriva do latim e significa “dentro do vivo”, abrangendo todo e qualquer ensaio ou avaliação que ocorra utilizando um organismo vivo.

Ao contrário dos estudos nanotoxicológicos em culturas celulares, aqueles que são realizados em organismos vivos permitem uma perspetiva global e integrada dos efeitos biológicos das NPs num órgão ou tecido específicos. Para além disso, é possível ainda avaliar as consequências da sua interação com componentes biológicos como o sistema imunitário (Durán, Guterres e Alves, 2014).

Outra vantagem facilmente reconhecida na utilização de organismos vivos é o facto de permitirem a quantificação da farmacocinética das partículas. Só depois de se compreender o

comportamento da NP no que diz respeito à sua absorção, distribuição, metabolização e eliminação dentro de um organismo, é possível o cálculo da dose ótima a administrar em humanos. No entanto, é importante referir que, mesmo em ensaios *in vivo*, os resultados podem ser dispare, uma vez que são facilmente afetados pelo tipo de organismo e pelo teste aplicado, devendo, por isso, ser feita uma escolha criteriosa de ambos antes de se avançar com qualquer estudo (Fischer e Chan, 2007; Saifi, Khan e Godugu, 2018). A fim de se conseguir uma maior uniformidade de resultados dentro da comunidade científica através da comparação e discussão da nanotoxicidade de diferentes materiais, era importante a criação de *guidelines* que auxiliassem esta avaliação, para que todos os compostos fossem avaliados dentro das mesmas condições, previamente avaliadas e aprovadas (Saifi, Khan e Godugu, 2018).

A principal desvantagem deste tipo de estudos é a manipulação de seres vivos, na medida em que os animais continuam sujeitos a condições de *stress* apesar de toda a regulamentação que já existe sobre este assunto, mantendo-se assim as questões de origem ética e emocional. Atualmente não é possível utilizar apenas culturas celulares para estudar a segurança de qualquer tipo de xenobiótico sem que os ensaios tenham sido anteriormente validados através da obtenção de resultados semelhantes em animais, o que na atualidade não se verifica com as NPs. Esta falha na transposição de resultados pode ser devida à mudança das características físico-químicas da própria NP quando dentro do organismo, mas também pode estar relacionada com erros que se cometem nos ensaios *in vitro*, como o uso de doses demasiado elevadas que nunca seriam atingidas, em proporção, num animal (Saifi, Khan e Godugu, 2018). A via de administração também é igualmente importante, já que poderá levar a extensões de absorção diferentes (Wu e Tang, 2018).

Desta forma, apesar de os estudos *in vivo* serem mais caros, morosos e eticamente questionáveis são, até à data, indispensáveis para a avaliação do comportamento das NPs (Wu e Tang, 2018).

Os principais órgãos envolvidos na toxicidade das NPs são os pulmões, o fígado, os rins e o baço, pelo facto de desempenharem funções essenciais a nível fisiológico (Wu e Tang, 2018). De seguida serão discutidos os diversos mecanismos de nanotoxicidade a nível pulmonar, hepático, renal e esplénico, baseados num conjunto de ensaios *in vivo*, resumidos na tabela 2, em anexo.

Para o desenrolar destes estudos nanotoxicológicos são necessários animais. Diferentes espécies podem ser utilizadas, sendo que a escolha irá depender não só do tipo, mas também das condições económicas do estudo. Alguns exemplos são os murganhos, ratos,

coelhos ou os suínos, no entanto, os roedores (quer murganhos, quer ratos) são a classe mais utilizada (Durán, Guterres e Alves, 2014).

Toxicidade pulmonar

O pulmão é uma das maiores portas de entrada para NPs estando, assim, muito suscetível à sua toxicidade, apesar de todos os mecanismos de defesa inerentes, como a tosse ou o espirro (Jia'en Li et al., 2010).

O principal mecanismo de toxicidade pulmonar das NPs é a inflamação descontrolada, que se traduz no aumento de citocinas pró-inflamatórias. A inflamação crónica pode facilmente culminar no aparecimento de fibrose pulmonar, já que muitas das citocinas que se encontram elevadas são também mediadores pró-fibróticos cuja função é o aumento do número de fibroblastos que contribuem para a sua formação (Han et al., 2016; Jia'en Li et al., 2010; Ko et al., 2018; Park et al., 2015; Saifi, Khan e Godugu, 2018; Sisler et al., 2016).

Para além da inflamação, uma resposta natural do sistema imunitário, as NPs podem também induzir stress oxidativo pelo aumento de ROS. Esta situação deve-se ao facto de as NPs terem uma grande reatividade com as moléculas do meio, devido à elevada área de superfície, o que provoca um aumento de ROS que a célula não consegue eliminar com os seus mecanismos antioxidantes (Han et al., 2016; Jia'en Li et al., 2010; Ko et al., 2018; Park et al., 2015; Sisler et al., 2016).

A lesão celular pode ser avaliada através da quantificação da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima intracelular que participa no metabolismo da glicose e é libertada para o espaço intersticial nestas situações (Han et al., 2016; Ko et al., 2018; Park et al., 2015; Sisler et al., 2016).

Park et al. estudou o efeito da inalação de NPs de cobre em murganhos asmáticos e verificou que, neste grupo, o quadro de inflamação era exacerbado e hiper-responsivo, agravando a sintomatologia da doença (Park et al., 2015). Por conseguinte, também outras doenças do foro cardiorrespiratório estarão agravadas em casos semelhantes a este, uma vez que se verifica, a longo prazo, uma diminuição da função pulmonar (Wu e Tang, 2018).

Toxicidade Hepática

O fígado é um órgão que desempenha diversas funções, principalmente a nível metabólico. É o segundo maior órgão do corpo humano e é neste que a grande maioria dos compostos, nomeadamente as NPs, sofre metabolização, tornando-o por isso num ponto de passagem obrigatória (Wu e Tang, 2018). Desta forma, também deve ser considerado nos

estudos de nanotoxicidade, pois tanto o contacto direto com as partículas como a sua deposição nos tecidos hepáticos podem ser potenciadores de efeitos nocivos (Jia et al., 2017).

A toxicidade deste órgão pode ser avaliada através do controlo da função hepática, do stress oxidativo, da inflamação dos tecidos e da presença de esteatose e necrose nos casos mais graves (Wu e Tang, 2018).

O comprometimento da função hepática traduz-se no aumento de um conjunto de enzimas intracelulares na corrente sanguínea, que são libertadas para o exterior em situações de lesão tecidular: a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina (ALP) (Shakeel et al., 2016).

As NPs também podem induzir toxicidade pela acumulação de ROS. Shakeel et al., verificou que os animais expostos às doses mais elevadas da NP têm a atividade de enzimas fulcrais na metabolização de ROS diminuída, entre as quais a Superóxido Dismutase (SOD), que converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio, a Catalase (CAT), que conduz à formação de água a partir do peróxido de hidrogénio, e a Glutathione S-transferase (GST), que “recicla” a glutathione reduzida (GSH) a partir da sua forma oxidada. A diminuição da atividade destas enzimas, nomeadamente da GST, conduz ao aumento da forma oxidada da glutathione, levando a um aumento do stress oxidativo (Jia et al., 2017; Kumari et al., 2014; Shakeel et al., 2016).

Na inflamação, à semelhança do que acontece nos outros tecidos, há um aumento de citocinas pró-inflamatórias entre elas as interleucinas e o fator de necrose tumoral. Em casos extremos, esta inflamação pode levar à formação de esteatose - acumulação de gordura no fígado -, vulgarmente conhecida como “fígado gordo”. Esta situação pode dever-se à inibição, por parte dos fatores de necrose tumoral (nomeadamente o alfa), de um recetor responsável por induzir a peroxidação lipídica, o PPAR- δ . Assim sendo, se a peroxidação lipídica estiver comprometida, vai haver acumulação de lípidos, o que origina a esteatose hepática (Jia et al., 2017).

Toxicidade Renal

A maioria dos resíduos metabólicos são eliminados através da urina, sobretudo os de menor tamanho. É, por isso, expectável que grande parte das NPs que entrem no nosso corpo sejam igualmente eliminadas por esta via. Para além de serem responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, os tecidos renais estão também muito suscetíveis

à acumulação de NPs, sendo por isso inevitável o seu estudo toxicológico (Wu e Tang, 2018).

Tal como em todos os órgãos, a toxicidade renal está relacionada com o aumento de mediadores inflamatórios, que podem culminar no aparecimento de fibrose (Chen et al., 2015; Wu e Tang, 2018). Para além disso, são facilmente observados marcadores de lesão renal, como o aumento de creatinina e de microglobulina na urina, indicativos de insuficiência renal aguda (Fontana et al., 2014; Rana et al., 2017; Wu e Tang, 2018). Todos estes efeitos adversos são consequência do contacto das partículas precipitadas com os tecidos renais, que originam condições de stress oxidativo (Huang et al., 2014; Wu e Tang, 2018).

Toxicidade Esplénica

O baço é um órgão que combina funções do sistema linfático e do sistema imunitário. De uma forma sucinta, é constituído por duas polpas: a polpa branca, onde estão armazenados os linfócitos, e a polpa vermelha, responsável pelo controlo, armazenamento e destruição dos eritrócitos (Abass et al., 2017; Mebius e Kraal, 2005; Sheng et al., 2014).

Tendo em conta que a maioria dos danos provocados pelas NPs tem subadjacente a inflamação, é de esperar que o baço também seja, de alguma forma, afetado por elas (Abasset et al., 2017; Sheng et al., 2014).

Sheng et al., avaliou a toxicidade de NPs de dióxido de titânio e concluiu que doses elevadas se encontram relacionadas com uma diminuição do número de linfócitos e eritrócitos libertados na corrente sanguínea - o que indica toxicidade esplénica -, descrevendo ainda alterações morfológicas neste órgão consequentes da exposição.

FARMACOCINÉTICA DAS NANOPARTÍCULAS

Para uma melhor compreensão da forma como as NPs interagem com os tecidos alvo no corpo humano e, por conseguinte, originam nanotoxicidade, é importante perceber não só de que maneira estas atingem a corrente sanguínea e os tecidos, mas também como são metabolizadas e eliminadas.

Os efeitos toxicológicos de uma NP estão dependentes não só da dose administrada e do tempo de exposição, mas também da forma como esta interage com o organismo em questão (Hagens et al., 2007).

Por possuírem características físico-químicas tão próprias, nomeadamente no que diz respeito ao seu tamanho nanométrico, as NPs têm um comportamento farmacocinético distinto das restantes partículas, o que leva a um perfil toxicológico muito característico e individualizado. Isto deve-se essencialmente ao facto de, ao apresentarem uma maior superfície de contacto, interagirem mais facilmente com o meio onde se encontram, seja este um tecido (saudável ou tumoral), um órgão ou um conjunto de tecidos e órgãos (Hagens et al., 2007; Li et al., 2016).

É nesta fase que se destaca a importância dos estudos farmacocinéticos, nomeadamente a avaliação da ADME, não só para se poder compreender os mecanismos de toxicidade subadjacentes, mas também para os cálculos das doses que devem ser ministradas em função da via de administração (Hagens et al., 2007).

Absorção

A absorção das NPs, que pressupõe a sua passagem através de uma barreira que separa o meio exterior da corrente sanguínea, está dependente das várias vias existentes, sendo umas mais comuns e importantes do que outras. No entanto, é importante referir que a grande maioria dos fármacos veiculados em NPs são administrados por via intravenosa, não se aplicando a etapa da absorção, razão pela qual a quantidade de estudos farmacocinéticos para as restantes vias não é abundante (Li et al., 2016).

As principais vias após as quais pode ocorrer a absorção são a via oral, pulmonar e cutânea (Hagens et al., 2007; Li et al., 2016).

Após serem ingeridas, as NPs são absorvidas ao longo do trato gastrointestinal por diversos processos, nomeadamente o transporte paracelular, transcitose ou por endocitose nas células M. Como será de esperar, as características que as NPs apresentam irão ditar a extensão de absorção através destas vias, sendo o tamanho e a carga da partícula as propriedades mais significativas. Partículas mais pequenas e carregadas positivamente sofrem uma maior extensão de absorção comparativamente com partículas de tamanho superior ou com carga negativa ou neutra. A via oral é, sem dúvida, uma das vias mais significativas, dada a grande quantidade de fármacos que entram no organismo desta forma (Hagens et al., 2007; Li et al., 2016).

A via pulmonar não é tão usada como via de administração de medicamentos compostos por NPs, no entanto, pode ser uma porta de entrada de NPs presentes no ar, em resultado da poluição atmosférica. Tal como para a via oral, as características físico-químicas das partículas têm influência na absorção pela via pulmonar. Mais de 80% das partículas inaladas

que apresentem um tamanho inferior a 100 nm ficam retidas no trato respiratório, não sendo, por isso, absorvidas. Neste caso, também a frequência de respiração tem um papel importante (Hagens et al., 2007).

A absorção cutânea, ou seja, através da pele, pressupõe a chegada das NPs a uma camada vascularizada, a derme, sendo necessária a passagem pela epiderme em primeiro lugar. A penetração das partículas pela epiderme está intimamente relacionada com a sua carga, sendo que partículas carregadas negativamente conseguem penetrar, ao invés de partículas com carga neutra ou positiva (Hagens et al., 2007).

Distribuição

Quando chegam à corrente sanguínea, as partículas vão distribuir-se pelos órgãos e tecidos em função das suas características e via de administração (oral, por inalação ou intravenosa). À semelhança do que acontece na absorção, a extensão da distribuição das NPs é inversamente proporcional ao tamanho da partícula e à sua ligação a proteínas plasmáticas, especialmente a albumina. A ligação das partículas a esta proteína resulta na redução da fração livre destas na corrente sanguínea, contribuindo para uma menor toxicidade (Hagens et al., 2007).

O efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*) consiste no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos que rodeiam um tumor, levando a uma maior retenção de moléculas nessas zonas, incluindo as NPs. Vários estudos sugerem que o efeito EPR varia de acordo com o tipo de tumor, podendo ter um papel importante na especificidade das NPs para os tecidos tumorais, permitindo assim uma distribuição específica sem causar toxicidade nos tecidos saudáveis. Atualmente, para permitir uma melhor especificidade das NPs para os tecidos, são incluídos constituintes proteicos na superfície da NP, que terão elevada afinidade para o tecido em causa (Li et al., 2016).

A distribuição das partículas pode ainda ter subadjacente a sua passagem por membranas biológicas, como é o caso da barreira hematoencefálica. Para atravessar esta membrana por difusão passiva, a NP precisa de ter características muito específicas, nomeadamente no que diz respeito ao tamanho (< 500 Da) e afinidade para substâncias lipofílicas. As restantes partículas só conseguem trespassar a membrana caso sejam substratos para os transportadores lá existentes, permitindo uma travessia por difusão facilitada ou transporte ativo (Hagens et al., 2007).

Metabolismo

A metabolização das NPs acontece no fígado por intermédio das enzimas hepáticas (Hagens et al., 2007). Este processo consiste numa série de reações catalisadas por enzimas que permitem a adição e/ou criação de grupos funcionais, tornando os compostos mais polares e, desta forma, mais facilmente eliminados.

Mais uma vez, a capacidade de metabolização no corpo humano e a forma como ocorre está relacionada com as características físico-químicas da partícula (Hagens et al., 2007). No entanto, o processo de metabolização pode ser um pouco complexo e imprevisível, uma vez que, dentro do corpo, estas características podem mudar devido a vários fatores, entre os quais o pH ácido. De qualquer modo, partículas formadas por compostos biodegradáveis (como é o caso das NPs lipídicas, proteicas ou de ácido poli(láctico co-glicólico) (PLGA)) são mais fácil e rapidamente metabolizadas do que as formadas por compostos não biodegradáveis (Li et al., 2016).

No caso de NPs formadas por compostos inertes, como é o caso do ouro, é provável que não ocorra a metabolização pelas enzimas hepáticas e que estas partículas sejam eliminadas sem serem metabolizadas (Hagens et al., 2007).

Eliminação

A eliminação pode ocorrer por via renal, através da urina, ou por via biliar, através das fezes. Para além destas duas vias principais, podem ser consideradas outras vias de eliminação, como é o caso da excreção nas glândulas sudoríparas ou através do leite. No entanto, não existem estudos farmacocinéticos suficientes que as confirmem devidamente (Hagens et al., 2007).

A eliminação por via renal é tão mais rápida quanto menor for o diâmetro das NPs, não se observando para partículas com diâmetro superior a 15 nm, cuja eliminação ocorre por via biliar. À semelhança da via renal (considerada a via de eliminação primária), a velocidade de eliminação biliar varia de forma inversa ao tamanho da partícula (Li et al., 2016).

Podem ser aplicados modelos farmacocinéticos no estudo do comportamento de uma partícula, possibilitando uma previsão do seu comportamento no organismo, a fim de se tirarem conclusões relativamente a doses terapêuticas ou tóxicas (Li et al., 2016).

Estes modelos podem ser divididos em duas classes: compartimentais e de base fisiológica. Ambos se traduzem por equações matemáticas que relacionam a concentração da NP no organismo em função do tempo e podem ser obtidos com recurso a vários *softwares* informáticos (Li et al., 2016).

Os modelos compartimentais são modelos que representam, de uma forma simples, a passagem da partícula pelo organismo e têm na absorção o principal mecanismo subjacente a esta. São modelos mais simples que os de base fisiológica e têm a desvantagem de não considerarem outras variáveis que possam afetar a farmacocinética das partículas (Lin e Wong, 2017).

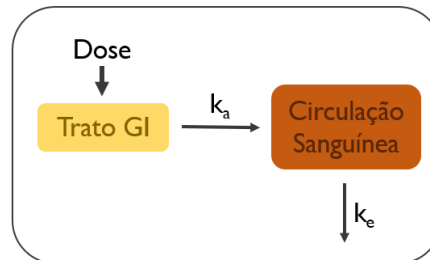


Figura 1: Modelo farmacocinético compartimental clássico (Adaptado de Lin e Wong, 2017)

Os modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK) diferem dos modelos compartimentais clássicos na medida em que os primeiros consideram outros processos para além da absorção, como o trânsito gastrointestinal ou o fluxo sanguíneo (Li et al., 2016). Nestes, todo o organismo é tido em atenção, sendo todos os órgãos/tecidos representados por um compartimento distinto. Nas extremidades podem observar-se 2 compartimentos de maiores dimensões: um referente ao sangue arterial que vai entrar nos diversos compartimentos e outro constituído pelo sangue venoso que sairá dos mesmos (Lin e Wong, 2017).

O esquema seguinte é um exemplo de um modelo PBPK para coelhos, realizado com auxílio do software *PK-Sim*[®], onde é possível observar o trajeto que uma NP percorreria por via oral e por via intravenosa.

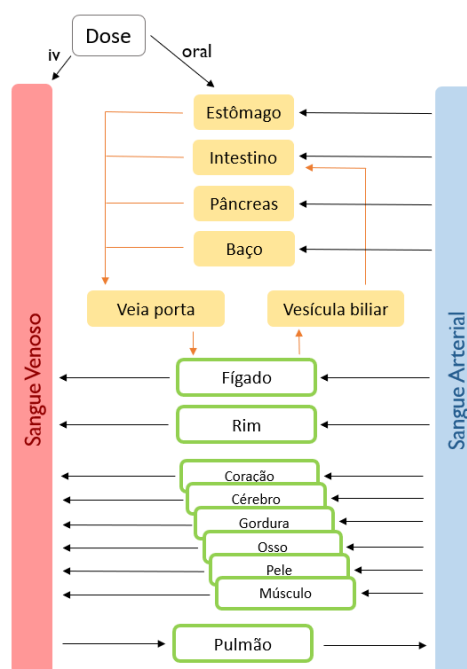


Figura 2: Exemplo de um modelo PBPK para coelhos elaborado com o software *PK-Sim*®
(Adaptado de Mavroudis et al., 2018)

Apesar de estes modelos serem mais sensíveis e específicos na previsão da concentração de partículas no organismo, quando aplicados às NPs podem estar sujeitos a algumas limitações, não só pelo facto de estas apresentarem um comportamento farmacocinético particular em função da sua constituição, mas também devido à falta de dados farmacocinéticos na literatura (Li et al., 2016).

TOXICOLOGIA DE NANOSSISTEMAS

Todas as investigações, ensaios e pesquisas têm como principal objetivo a obtenção de um produto que, dada a sua constituição, tenha os seus efeitos terapêuticos maximizados, com o mínimo de efeitos secundários associados. A utilização de NPs veio auxiliar esta conquista, uma vez que o aumento da área de superfície possibilita uma maior solubilidade do fármaco, em consequência do seu tamanho nanométrico (Farjadian et al., 2018).

Por tudo isto, a nanotecnologia e a obtenção de nanotransportadores tem vindo a crescer de forma exponencial nas últimas décadas, com mais de 100 produtos a serem aprovados para comercialização pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Farjadian et al., 2018). Por conseguinte, e como já tem sido referido ao longo desta monografia, é

igualmente importante perceber de que forma é que estes nanotransportadores podem induzir toxicidade no organismo, uma vez que não são totalmente inócuos.

Ao longo deste tópico irão ser abordados quatro tipos de NPs (lipossomas, NPs poliméricas e metálicas e micelas poliméricas) no que diz respeito à sua toxicidade.

Lipossomas

Os lipossomas são pequenas vesículas lipídicas que se podem dividir em dois grupos: os lipossomas unilamelares, constituídos por uma única bicamada fosfolipídica, permitindo a incorporação e transporte de fármacos hidrofílicos no seu núcleo aquoso; e os multilamelares, mais completos e complexos, com duas bicamadas de fosfolípidos, onde podem ser incorporados tanto fármacos hidrofílicos (no núcleo), como lipofílicos (entre as bicamadas) (Farjadian et al., 2018).

Para além dos fosfolípidos, os lipossomas podem ter outras moléculas na sua constituição a fim de aumentar a estabilidade e a eficiência do nanotransportador. O colesterol e o polietilenoglicol (PEG) são dois constituintes muitas vezes incorporados nos lipossomas. O colesterol permite uma maior estabilidade da vesícula, uma vez que é intercalado entre as cadeias fosfolipídicas, impedindo assim a interação entre elas; e o PEG diminui o reconhecimento do lipossoma pelo sistema reticuloendotelial, quando inserido à superfície do transportador (Kapoor, Lee e Tyner, 2017).

De acordo com os dados da FDA, os lipossomas são os nanomateriais mais utilizados, possuindo cerca de 30% deste mercado, e sendo o cancro a sua principal indicação terapêutica (Kapoor, Lee e Tyner, 2017).

Um exemplo de um fármaco lipossomal já inserido no mercado é o *AmBisome*[®] - nome comercial para a forma lipossomal da anfotericina B -, um antifúngico com largo espectro de ação (Kapoor, Lee e Tyner, 2017). Este fármaco é amplamente utilizado e muito menos tóxico quando comparado com a sua forma convencional (não lipossomal), podendo ser administrado por via parenteral. No entanto, apesar de eficaz, são reportadas com alguma frequência reações de hipersensibilidade ao lipossoma, manifestadas por desconforto abdominal e no peito ou dispneia, que cessam com o terminar da infusão ou com a administração de anti-histamínicos (Stone et al., 2016).

Nath et al. relata o caso de dois pacientes que desenvolveram reações de hipersensibilidade ao lipossoma após um tratamento com *AmBisome*[®]. Um dos pacientes manifestou problemas respiratórios enquanto que o outro demonstrou angioedema facial. Nesta sequência, teve de ser injetada uma mistura de adrenalina, difenidramina e

hidrocortisona a ambos os doentes, para tratamento sintomático. Nath *et al.* conclui sublinhando que neste tipo de tratamento se deve garantir não só uma supervisão adequada, como o suporte necessário (Nath *et al.*, 2014).

Nanopartículas Metálicas

As NPs metálicas podem ser puras ou oxidadas e foram inicialmente identificadas por Faraday, em 1857 (Dayem, Lee e Cho, 2018).

Podem ser atribuídas várias aplicações a estas NPs, não só ao nível do diagnóstico (agentes de contraste, por exemplo), mas também como agentes terapêuticos, uma vez que as suas ações anticancerígenas e antibacterianas estão comprovadas. Neste grupo incluem-se as NPs de prata, que são utilizadas no tratamento do cancro por induzirem o aumento da p-53 e de ROS, ativando desta forma as vias de apoptose. Para além disso, as NPs de prata, bem como as de zinco, têm também reconhecidas as suas propriedades antibacterianas por mecanismos que não levam ao aparecimento de resistências (Dayem, Lee e Cho, 2018).

Feraheme[®], um fármaco aprovado pela FDA em 2009, consiste numa formulação intravenosa de NPs de ferro e é utilizado no tratamento da anemia em adultos que apresentem deficiência férrica (Farjadian *et al.*, 2018).

Apesar de imprescindível no tratamento da anemia, o *Feraheme*[®] é apontado como responsável por alguma imunotoxicidade em vários estudos, não se conhecendo ainda o mecanismo pelo qual esta acontece. Esta situação foi comprovada por Shah *et al.*, que estudou o efeito do medicamento numa cultura primária de células T, observando uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento do stress oxidativo mitocondrial. De seguida, comparou o efeito imunotóxico do *Feraheme*[®] com o de outras formulações contendo ferro (*Venofer*[®], *Injectafer*[®] e *Ferrlecit*[®]), tendo concluído que os danos mitocondriais com conseqüente comprometimento da função das células T são específicos do *Feraheme*[®] (Shah *et al.*, 2018).

Nanopartículas Poliméricas

Alguns polímeros podem ser utilizados à escala nanométrica para a encapsulação de agentes terapêuticos graças à sua estabilidade gastrointestinal (Farjadian *et al.*, 2018; Pridgen, Alexis e Farokhzad, 2015). Torna-se então possível que fármacos instáveis sejam administrados oralmente, já que ficam protegidos não só do pH gástrico, como também das enzimas digestivas (Pridgen, Alexis e Farokhzad, 2015).

O tipo de polímero utilizado para encapsular um fármaco pode variar, existindo NPs derivadas de polímeros naturais e NPs derivadas de polímeros sintéticos, resumidos na Tabela 3 (Defrates et al., 2018; Parisi et al., 2017; Wang et al., 2019).

Tabela 3: NPs Poliméricas (Defrates et al., 2018; Parisi et al., 2017; Wang et al., 2019)

Derivadas de Polímeros Naturais	Derivadas de Polímeros Sintéticos
Quitossano, Ácido Hialurônico, Alginato, Gelatina, Celulose, Ciclodextrina, Queratina, Colagênio, Hemoglobina, Albumina e Glúten.	PLGA, Policaprolactona (PCL), entre outros polipéptidos.

Estes nanotransportadores têm a vantagem de serem extremamente biocompatíveis e biodegradáveis, minimizando tanto a resposta imunológica como a acumulação no hospedeiro (Parisi et al., 2017). Há que considerar, no entanto, que os polímeros naturais têm uma maior biocompatibilidade. Por outro lado, os sintéticos são mais versáteis, podendo ser utilizados em conjunto com outros componentes (Wang et al., 2019).

Como exemplo de um medicamento com este tipo de NP consideremos o *Neulasta*[®] - a forma peguizada do filgrastim. Este fator de crescimento de glóbulos brancos é utilizado no tratamento e na prevenção de neutropenias (Farjadian et al., 2018; Kasi, Patnaik e Peethambaram, 2013). A Neutropenia Febril (NF) associa a baixa contagem de leucócitos a elevadas temperaturas corporais e é um efeito adverso muito frequente nos doentes que recebem quimioterapia (Misra et al., 2017).

Apesar de tudo, a dor nos ossos é frequentemente reportada como efeito adverso dos estimuladores da granulocitose, sendo a incidência destas notificações significativamente superior no caso do *Neulasta*[®]. Romeo, Li e Copeland apresentam, no seu trabalho de investigação, um *case report* onde o tratamento profilático com loratadina aliviou completamente a dor óssea associada ao *Neulasta*[®]. Sendo a loratadina um anti-histamínico, pode sugerir-se que o mecanismo da dor está relacionado com a libertação de histamina durante o processo inflamatório (Romeo, Li e Copeland, 2014).

Micelas Poliméricas

As micelas poliméricas são NPs esféricas de co-polímeros anfífilicos. O seu núcleo hidrofóbico possibilita a incorporação de fármacos insolúveis em água, como é o caso do paclitaxel ou da doxorubicina (Farjadian et al., 2018). Este mesmo núcleo, ao funcionar como reservatório do fármaco, previne fenómenos de opsonização e de adsorção que iriam diminuir a concentração do medicamento na corrente sanguínea (Deshmukh et al., 2017). Por

outro lado, o uso destas micelas como agentes solubilizantes diminui a toxicidade da formulação, uma vez que não há necessidade de utilizar compostos mais tóxicos (Gupta et al., 2015).

As micelas são formadas termodinamicamente quando a concentração dos monómeros proteicos existentes no meio ultrapassa a *Concentração Micelar Crítica* (CMC). Nesta fase, os monómeros aglomeram-se e formam a micela (Deshmukh et al., 2017). Sendo essencialmente utilizadas como transportadores de fármacos anticancerígenos, é um grande desafio avaliar a sua toxicidade isoladamente, já que os efeitos adversos da NP são facilmente mascarados pelos dos fármacos anticancerígenos. Com esta situação em mente, Kawaguchi et al. avaliou a toxicidade de micelas poliméricas vazias, concluindo que não provocavam qualquer anomalia patológica, apenas uma ativação transitória do sistema mononuclear fagocitário (Kawaguchi et al., 2009; Yokoyama, 2014).

O paclitaxel (PTX) é um fármaco antineoplásico utilizado no tratamento de várias formas de cancro, podendo ser utilizado tanto em tumores sólidos como disseminados, e tem tido um papel especialmente importante no cancro da mama e dos ovários (Bernabeu et al., 2017). O *Taxol*[®], um medicamento já comercializado, consiste em micelas poliméricas com PTX. Apesar do seu largo espectro de atividade antitumoral, o *Taxol*[®] tem uma utilidade limitada como medicamento, devido às reações de hipersensibilidade provocadas pela micela. De forma a prevenir uma reação potencialmente fatal, todos os pacientes em vias de receber tratamento com *Taxol*[®] deverão ser profilaticamente medicados com corticoides, antagonistas H₂ e anti-histamínicos (Bernabeu et al., 2017).

CONCLUSÃO

Vários fatores contribuem para a toxicidade das NPs, porém, a dose sobrepõe-se a todos os outros.

No que diz respeito à correlação *in vivo/in vitro*, verifica-se a existência de algumas lacunas nos ensaios *in vitro*, o que impede, por enquanto, a eliminação completa dos estudos em animais. Deve-se apostar numa maior regulamentação desta área, uniformizando os testes realizados nas NPs, para que se possam estabelecer perfis comparativos devidamente.

Ao avaliar o perfil toxicológico de diversas NPs, é possível encontrar alguns fatores comuns, apesar de ainda não se conseguir esclarecer com clareza o mecanismo de

toxicidade pelo facto de existirem diversas características físico-químicas que podem ser alteradas quando a partícula entra no organismo.

As reações de hipersensibilidade parecem ser o efeito adverso mais reportado em todas as NPs correspondendo a situações que podem e devem ser colmatadas com o uso de anti-histamínicos. No caso das NPs poliméricas, mais especificamente para o Neulasta®, é ainda reportada dor nos ossos como efeito adverso à partícula.

A utilização de NPs como transportadores de fármacos é, sem dúvida, o futuro. Sendo uma área em constante crescimento e desenvolvimento, decerto que serão colmatadas todas as lacunas existentes no que diz respeito à regulamentação da área num futuro próximo, para que seja possível, a partir daí, retirar conclusões mais fidedignas acerca dos mecanismos de toxicidade envolvidos.

Tabela 3: Ensaios *in vivo* com nanopartículas

Fonte	Objetivo do estudo	Nanopartícula	Condições	Animais	Resultados
Sisler et al., 2016	Avaliar os efeitos pulmonares consequentes da inalação de NPs de Monóxido de Cobalto (CoO) e de Óxido de Lantânio (La ₂ O ₃) em murganhos.	CoO La ₂ O ₃	Toxicidade Pulmonar Os murganhos foram expostos a vários tipos de ar, durante 4 dias (sendo depois devidamente analisados 1 hora e 1, 7 e 56 dias após a exposição): - Ar filtrado (Controlo); - Ar contaminado com 10 ou 30 mg/m ³ de NPs de CoO (Teste); - Ar contaminado com 10 ou 30 mg/m ³ de NPs de La ₂ O ₃ (Teste).	Murganhos	A % de CoO após a primeira hora foi bastante superior à de La ₂ O ₃ ; no entanto, após os 56 dias a % de CoO era residual enquanto que a de La ₂ O ₃ se manteve. Desta forma, concluiu-se que o CoO induz maior toxicidade aguda, enquanto que La ₂ O ₃ se relaciona mais com toxicidade crónica. Ambas as NPs induziram um aumento da LDH e do número de leucócitos e citocinas (IL-1 β , TNF α , IL-6) no fluido broncoalveolar.
Han et al., 2016	Avaliar os efeitos tóxicos de vários tipos de NPs de Sílica (Si) em murganhos, após administração intranasal .	Si	Administração intranasal dos vários tipos de NPs de Si (esféricas, mesoporosas, conjugadas com polietilenoglicol ou com a ovalbumina), 3 vezes por semana, durante 2 semanas, com consequente avaliação dos resultados.	Murganhos	Houve um aumento da resposta inflamatória com todas as NPs (quer devido ao aumento da concentração de IL-5, IL-13, IL-1 β , e IFN- γ , quer devido ao aumento do número de células inflamatórias). As NPs mesoporosas foram aquelas que induziram uma maior resposta e as conjugadas com polietilenoglicol as menos tóxicas.
Park et al., 2015	Avaliar os efeitos da inalação de NPs de Cobre (Cu) em murganhos asmáticos.	Cu	O estudo está dividido em duas fases principais: na primeira (Controlo) são estudados os efeitos nos murganhos saudáveis, enquanto que na segunda fase (Teste) é induzida asma nos animais e são avaliados os mesmos efeitos, nas mesmas condições. Em ambas as fases, os animais estão divididos em 4 grupos, que recebem 0, 25, 50 e 100 μ g/kg da nanopartícula numa solução de PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>), durante 3 dias.	Murganhos	A exposição a estas NPs levou a um aumento da resposta inflamatória pulmonar, consequência de uma elevação das citocinas pró-inflamatórias, e de ROS , todos mediadores estimulatórios de neutrófilos. Nos animais asmáticos verificou-se uma maior concentração de eosinófilos . Consequentemente, a exposição a estas NPs e o consequente aumento de células inflamatórias, agravam a hiper-responsividade brônquica e a produção de muco, piorando o quadro de asma .
Ko et al., 2018	Avaliar o agravamento de lesões pulmonares, previamente induzidas, após a administração intranasal de NPs de Dióxido de Silício (SiO ₂) em murganhos.	SiO ₂	Neste estudo, os animais foram divididos em dois grupos: - o grupo Teste foi tratado previamente com lipopolissacarídeo, um composto que origina lesões pulmonares.	Murganhos	A exposição a estas NPs levou a um aumento do número de células pró-inflamatórias e de citocinas no fluido broncoalveolar. Estas mudanças ocorreram tanto no grupo

				- o grupo Controlo não foi previamente tratado com qualquer substância. De seguida, foi administrada a NP aos dois grupos, por via intranasal.		Controlo como no grupo Teste. Nos animais com lesão pulmonar previa, houve um efeito sinérgico.
Toxicidade Hepática						
Kumari et al., 2014	Avaliação da toxicidade de NPs de Óxido de Cério (CeO ₂) em ratos Wistar após uma dose única, administrada por via oral .	CeO ₂		Os ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: o grupo de controlo positivo, o de controlo negativo e o experimental. O grupo experimental foi posteriormente dividido em outros três grupos que receberam diferentes doses da NP (100, 500 e 1000 mg/kg peso corporal). Os animais foram expostos a uma dose única e posteriormente sacrificados para avaliação dos resultados.	Ratos	Os ratos que receberam a dose mais alta de CeO ₂ , apresentaram necrose em algumas zonas do tecido hepático aquando da avaliação histológica. Quanto aos parâmetros bioquímicos verificou-se um aumento da ALP , da LDH e da GSH .
Jia et al., 2017	Avaliação da toxicidade hepática após administração oral de NPs de Prata (Ag) em murganhos com excesso de peso induzido.	Ag	Os animais foram divididos em 2 grupos, Teste e Controlo. Os primeiros foram alimentados com uma dieta normal, enquanto que os segundos foram alimentados com uma Dieta Rica em Gordura, durante 8 semanas. Após este período, foi-lhes dado, por via oral, 100 ou 300 mg/kg de uma solução aquosa da NP, diariamente por um período de 14 dias. Os resultados foram avaliados.	Murganhos	Após a análise histológica, verificou-se uma acumulação das NPs em todos os órgãos maioritários. No entanto a acumulação hepática foi muito superior. Houve um aumento de GSH bem como de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, e fator de necrose tumoral) e de esteatose . Nos animais obesos, as NPs potenciaram a esteatose já pré-existente.	
Shakeel et al., 2016	Avaliação dos efeitos tóxicos a nível hepático e sanguíneo após a administração subcutânea de NPs de Dióxido de Titânio (TiO ₂) em ratos.	TiO ₂	Os animais foram divididos em 4 grupos, a cada um dos quais foi administrada, subcutaneamente, uma concentração da NP (0, 50, 100 or 150 mg/kg de peso corporal), em dias alternados, durante 28 dias.	Ratos	Comparativamente ao grupo controlo (0 mg/kg de NP), os grupos experimentais apresentaram: - níveis elevados de ALT , AST e ALP . - diminuição da atividade das enzimas: CAT , SOD e GST .	
Toxicidade Renal						
Chen et al., 2015	Observar a toxicidade renal aguda, após a administração intraperitoneal de NPs de Sílica (Si) a murganhos	Si	Os animais foram divididos em 2 grupos e receberam, intraperitonealmente, diferentes doses da NP: 150, 300, ou 600 mg/kg de peso corporal. Após a administração, os animais sofreram eutanásia, para que os resultados fossem avaliados. O primeiro grupo 2 dias após a administração e o segundo 12 dias após a administração.	Murganhos	Dois dias após a exposição é possível observar fibrose nos tecidos intersticiais. Verificou-se também um aumento de mediadores de inflamação que culminam no aumento dos marcadores de fibrose, entre eles o NF-κB .	
Rana et al., 2017	Avaliar a toxicidade renal de NPs de Sulfito de Cádmio (CdS), após administração por sonda , a ratos.	CdS	Os ratos receberam, em dias alternados, durante 45 dias, a dose de 10 mg/kg de peso corporal da NP. Após a administração, foram avaliados os resultados.	Ratos	Observou-se a nível renal: aumento da peroxidase lipídica e de H₂O₂ bem como um aumento da concentração de creatinina na urina. Verificou-se ainda perda de fosfatase alcalina , o que confirma a toxicidade renal	

Fontana et al., 2014	Avaliação da toxicidade renal de NPs de Paládio (Pd) após injeção de uma solução com a NP a ratos.	Pd		Os ratos foram divididos em 5 grupos, sendo um deles o grupo controle, e receberam 0,012, 0,12, 1,2 ou 12 mg/kg de peso corporal da NP.	Ratos	para além do aumento do stress oxidativo renal, através do aumento de ROS . Verificou-se um aumento significativo tanto de Proteínas de Ligação ao Retinol como de β₂-Microglobulina na urina, indicativo de lesão renal.
Huang et al., 2014	Avaliação da toxicidade renal de NPs de Dióxido de Titânio (TiO ₂) por instilação a murganhos.	TiO ₂		Os animais receberam doses da NP que variaram entre 0,1, 0,25, and 0,5 mg/semana, durante 4 semanas.	Murganhos	Os efeitos tóxicos da NP foram dose-dependentes. Observou-se precipitação renal da NP para a dose maior, marcadores de stress oxidativo (ROS) e de fibrose incluindo: nitrososina, fator de hipoxia induzível 1α (HIF-1α), fator de crescimento β (TGF-β) e colagénio II.
Toxicidade Esplénica						
Abass et al., 2017	Avaliar a toxicidade no baço e no timo de NPs de Óxido de Zinco (ZnO), após administração oral a ratos.	ZnO		Os animais foram divididos em 2 grupos: o grupo controle e o grupo teste (que recebeu o tratamento com a NP). Os animais pertencentes ao grupo teste receberam uma dose de 350 mg/kg de peso corporal da NP. Posteriormente, os resultados foram avaliados.	Ratos	Observou-se um aumento significativo de: - TNF-α , INF-c e citocinas pró-inflamatórias . Histologicamente, os tecidos dos animais no grupo teste apresentavam alguma degeneração como atrofia da polpa branca, aparecimento de vacúolos e apoptose de alguns esplenócitos.
Sheng et al., 2014	Avaliação da toxicidade esplénica de NPs de Dióxido de Titânio (TiO ₂) após administração intragástrica a murganhos	TiO ₂		Os animais receberam doses de 2,5, 5 ou 10 mg/kg de peso corporal, por via intragástrica, durante 9 dias consecutivos. Após este tempo foram avaliados os resultados da toxicidade ao nível do baço.	Murganhos	Quanto maior a dose de NP, menor o número de glóbulos brancos e vermelhos, linfócitos, neutrófilos, plaquetas, hemoglobina, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e células B Na análise histopatológica do tecido é possível observar acumulação da NP bem como alteração da morfologia dos esplenócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DALGLEISH, T.; WILLIAMS, J. M. G.; GOLDEN, A. J.; PERKINS, N.; BARRETT, L. F.; BARNARD, P. J. - **Nanoethics and Nanotoxicology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011 ISBN 978-3-642-20176-9.
2. SAIFI, M. A.; KHAN, W.; GODUGU, C. - **Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles**. *Pharmaceutical Nanotechnology*. **6**, (2018) 3-16.
3. WU, T.; TANG, M. - **Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs**. *Journal of Applied Toxicology*. **38**, (2018) 25-40.
4. AZHDARZADEH, M.; SAEI, A. A.; SHARIFI, S.; HAJIPOUR, M. J.; ALKILANY, A. M.; SHARIFZADEH, M.; RAMAZANI, F.; LAURENT, S.; MASHAGHI, A.; MAHMOUDI, M. - **Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology**. *Nanomedicine*. **10**, (2015) 2931-2952.
5. TALKAR, S.; DHOBLE, S.; MAJUMDAR, A.; PATRAVALE, V. - **Experimental Medicine and Biology: Transmucosal Nanoparticles: Toxicological Overview**. Mumbai, India: Department of Pharmaceutical Sciences and Technology, Institute of Chemical Technology, 2018 ISBN 978-3-3197-2041-8 37-57.
6. AJDARY, M.; MOOSAVI, M. A.; RAHMATI, M.; FALAHATI, M.; MAHBOUBI, M.; MANDEGARY, A.; JANGJOO, S.; MOHAMMADINEJAD, R.; VARMA, R. S. - **Health Concerns of Various Nanoparticles: A Review of Their in Vitro and in Vivo Toxicity**. *Nanomaterials*. **8**, (2018) 1-28.
7. ADABI, M.; ADABI, M.; NAGHIBZADEH, M.; ADABI, M.; ZARRINFARD, M. A.; ESNAASHARI, S. S.; SEIFALIAN, A. M.; FARIDI-MAJIDI, R.; AIYELABEGAN, H. T.; GHANBARI, H. - **Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine**. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. **45**, (2017) 833-842.
8. DURÁN, N.; GUTERRES, S. S.; ALVES, O. L. - **Nanotoxicology: Nanomedicine and Nanotoxicology**. New York: Springer New York, 2014 ISBN 978-1-4614-8992-4.
9. STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. - **Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives**. *Acta histochemica*. **120**, (2018) 159-167.
10. ATES, G.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V.; RODRIGUES, R. M. - **Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay**. *Cell Viability Assays: Methods and*

- Protocols, Methods in Molecular Biology. **1601**, (2017) 19-26.
11. JEMAÀ, M.; FEZAI, M.; BISSINGER, R.; LANG, F. - **Methods Employed in Cytofluorometric Assessment of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death.** Cellular Physiology and Biochemistry. **43**, (2017) 431-444.
 12. SENA, C. M.; LEANDRO, A.; AZUL, L.; SEIÇA, R.; PERRY, G. - **Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches.** Frontiers in Physiology. **9**, (2018) 1-11.
 13. OPARKA, M.; WALCZAK, J.; MALINSKA, D.; VAN OPPEN, L.; SZCZEPANOWSKA, J.; KOOPMAN, W.; WIECKOWSKI, M. - **Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer.** Methods. **109**, (2016) 3-11.
 14. EUROPEAN COLLECTION OF AUTHENTICATED CELL CULTURES - **Fundamental Techniques in Cell Culture.** 3rd Ed. Sigma-Aldrich, 2011 ISSN 00928674.
 15. KIM, Y. H.; FAZLOLLAHI, F.; KENNEDY, I. M.; YACOBI, N. R.; HAMM-ALVAREZ, S. F.; BOROK, Z.; KIM, K.; CRANDALL, E. D. - **Alveolar Epithelial Cell Injury Due to Zinc Oxide Nanoparticle Exposure.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **182**, (2010) 1398-1409.
 16. KROLL, A.; DIERKER, C.; ROMMEL, C.; HAHN, D.; WOHLLEBEN, W.; SCHULZE-ISFORT, C.; GÖBBERT, C.; VOETZ, M.; HARDINGHAUS, F.; SCHNEKENBURGER, J. - **Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays.** Particle and fibre toxicology. **8**, (2011) 1-9.
 17. PUJALTÉ, I.; PASSAGNE, I.; BROUILLAUD, B.; TRÉGUER, M.; DURAND, E.; OHAYON-COURTÈS, C.; L'AZOU, B. - **Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells.** Particle and Fibre Toxicology. **8**, (2011) 1-10.
 18. LANONE, S.; ROGERIEUX, F.; GEYS, J.; DUPONT, A.; MAILLOT-MARECHAL, E.; BOCZKOWSKI, J.; LACROIX, G.; HOET, P. - **Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines.** Particle and Fibre Toxicology. **6**, (2009) 1-12.
 19. SAYES, C. M.; REED, K. L.; WARHEIT, D. B. - **Assessing toxicology of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles.** Toxicological Sciences. **97**, (2007) 163-180.
 20. FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. - **Nanotoxicity: the growing need for in vivo study.** Current Opinion in Biotechnology. **2**, (2007) 565-571.
 21. JIA'EN LI, J.; MURALIKRISHNAN, S.; NG, C.; YUNG, L. L.; BAY, B. - **Nanoparticle-induced pulmonary toxicity.** Experimental Biology and Medicine. **235**, (2010) 1025-1033.

22. HAN, H.; PARK, Y. H.; PARK, H. J.; LEE, K.; UM, K.; PARK, J.; LEE, J. - **Toxic and adjuvant effects of silica nanoparticles on ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice.** *Respiratory Research*. **17**, (2016) 1-10.
23. KO, J.; LEE, H.; SHIN, NA.; SEO, Y.; KIM, S.; SHIN, I.; KIM, J. - **Silicon Dioxide Nanoparticles Enhance Endotoxin-Induced Lung Injury in Mice.** *Molecules*. **23**, (2018) 1-10.
24. PARK, J.; LEE, I.; SHIN, N.; JEON, C.; KWON, O.; KO, J.; KIM, J.; OH, S.; SHIN, I.; AHN, K. - **Copper oxide nanoparticles aggravate airway inflammation and mucus production in asthmatic mice via MAPK signaling.** *Nanotoxicology*. **10**, (2015) 445-452.
25. SISLER, J. D.; LI, R.; MCKINNEY, W.; MERCER, R. R.; JI, Z.; XIA, T.; WANG, X.; SHAFFER, J.; ORANDLE, M.; MIHALCHIK, A. L.; BATTELLI, L.; CHEN, B. T.; WOLFARTH, M.; ANDREW, M. E.; SCHWEGLER-BERRY, D.; PORTER, D. W.; CASTRANOVA, V.; NEL, A.; QIAN, Y. - **Differential pulmonary effects of CoO and La₂O₃ metal oxide nanoparticle responses during aerosolized inhalation in mice.** *Particle and Fibre Toxicology*. **13**, (2016) 1-17.
26. SHAKEEL, M.; JABEEN, F.; QURESHI, N. A.; FAKHR-E-ALAM, M. - **Toxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and Titanium Dioxide Bulk Salt in the Liver and Blood of Male Sprague-Dawley Rats Assessed by Different Assays.** *Biol Trace Elem Res*. **173**, (2016) 405-426.
27. JIA, J.; LI, F.; ZHOU, H.; BAI, Y.; LIU, S.; JIANG, Y.; JIANG, G.; YAN, B. - **Oral Exposure to Silver Nanoparticles or Silver Ions May Aggravate Fatty Liver Disease in Overweight Mice.** *Environmental Science & Technology*. **51**, (2017) 9334-9343.
28. KUMARI, M.; KUMARI, I. S.; KAMAL, S. S. K.; GROVER, P. - **Genotoxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure.** *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **775-776**, (2014) 7-19.
29. CHEN, X.; ZHOUHUA, W.; JIE, Z.; XINLU, F.; JINQIANG, L.; YUWEN, Q.; ZHIYING, H. - **Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway.** *International Journal of Nanomedicine*. **10**, (2015) 1-22.
30. FONTANA, L.; LESO, V.; MARINACCIO, A.; CENACCHI, G.; PAPA, V.; LEOPOLD, K.; SCHINDL, R.; BOCCA, B.; ALIMONTI, A.; IAVICOLI, I. - **The effects of palladium nanoparticles on the renal function of female Wistar rats.** *Nanotoxicology*. **9**, (2014) 843-851.

31. RANA, K.; Verma, Y.; Rani, V.; Rana, S. V. S. - **Renal toxicity of nanoparticles of cadmium sulphide in rat.** Chemosphere. **193**, (2017)142-150.
32. HUANG, K.; WU, C.; HUANG, K.; LIN, W.; CHEN, C.; GUAN, S.; CHIANG, C.; LIU, S. - **Titanium nanoparticles inhalation induces renal fibrosis in mice via an oxidative stress-up-regulated transforming growth factor- β pathway.** Chemical Research in Toxicology. **28**, (2014) 354-364.
33. ABASS, M. A.; SELIM, S. A; SELIM, ASSMAA O.; EL-SHAL, A.; GOUDA, Z. A. - **Effect of Orally Administered Zinc Oxide Nanoparticles on Albino Rat Thymus and Spleen.** IUBMB LIFE. **69**, (2017) 528-539.
34. MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. - **Structure and Function of the Spleen.** Nature. **5**, (2005) 606-616.
35. SHENG, L.; WANG, L.; SANG, X.; ZHAO, X.; HONG, J.; CHENG, S.; YU, X.; LIU, D.; XU, B.; HU, R.; SUN, Q.; CHENG, J.; CHENG, Z.; GUI, S.; HONG, F. - **Nano-sized titanium dioxide-induced splenic toxicity : A biological pathway explored using microarray technology.** Journal of Hazardous Materials. **278**, (2014) 180-188.
36. HAGENS, W. I.; Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; Jong, W. H.; Cassee, F. R.; Sips, J.A.M. - **What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?** Regulatory Toxicology and Pharmacology. **49**, (2007) 217-229.
37. LI, M.; ZOU, P.; TYNER, K.; LEE, S. - **Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pharmaceutical Nanoparticles.** The AAPS Journal. **19**, (2016) 26-42.
38. LIN, L.; WONG, H. - **Predicting oral drug absorption: Mini review on physiologically-based pharmacokinetic models.** Pharmaceutics. **9**, (2017) 1-41.
39. MAVROUDIS, P. D.; HERMES, H. E.; TEUTONICO, D.; PREUSS, T. G.; SCHNECKENER, S. - **Development and validation of a physiology-based model for the prediction of pharmacokinetics/toxicokinetics in rabbits.** PLoS ONE. **13**, (2018) 194-294.
40. FARJADIAN, F.; GHASEMI, A.; GOHARI, O.; ROOINTAN, A.; KARIMI, M. - **Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market : challenges and opportunities.** Nanomedicine. **14**, (2018) 93-126.
41. KAPOOR, M.; LEE, S. L.; TYNER, K. M. - **Liposomal Drug Product Development and Quality: Current US Experience and Perspective.** American Association of Pharmaceutical Scientists. **19**, (2017) 632-641.
42. STONE, N.; BICANIC, T.; SALIM, R.; HOPE, W. - **Liposomal Amphotericin B (AmBisome): A Review of the Pharmacokinetics , Pharmacodynamics , Clinical Experience and Future Directions.** Drugs. **76**, (2016) 485-500.
43. NATH, P.; BASHER, A.; HARADA, M.; SARKAR, S.; SELIM, S.; MAUDE, R. J.; NOIRI, E;

- FAIZ, A. - **Immediate hypersensitivity reaction following liposomal amphotericin-B (AmBisome) infusion.** *Tropical Doctor*. **44**, (2014) 241-242.
44. DAYEM, A. A.; LEE, S. B.; CHO, S. - **The Impact of Metallic Nanoparticles on Stem Cell Proliferation and Differentiation.** *Nanomaterials*. **8**, (2018) 1-32.
45. SHAH, A.; MANKUS, C. I.; VERMILYA, A. M.; SOHEILIAN, F.; CLOGSTON, J. D.; DOBROVOLSKAIA, M. A. - **Feraheme supresses immune function of human T lymphocytes through mitochondrial damage and mitoROS production.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. **350**, (2018) 52-63.
46. PRIDGEN, E. M.; ALEXIS, F.; FAROKHZAD, O. C. - **Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications.** *Informa healthcare*. **12**, (2015) 1-15.
47. DEFRATES, K.; MARKIEWICZ, T.; GALLO, P.; RACK, A.; WEYHMILLER, A.; JARMUSIK, B.; HU, X. - **Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications.** *International Journal of Molecular Sciences*. **19**, (2018) 1-20.
48. PARISI, O. I.; SCRIVANO, L.; SINICROPI, M. S.; PUOCI, F. - **Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy.** *Current Opinion in Pharmacology*. **36**, (2017) 72-77.
49. WANG, B.; WANG, S.; ZHANG, Q.; DENG, Y.; LI, X.; PENG, L.; ZUO, X.; PIAO, M.; KUANG, X.; SHENG, S.; YU, Y. - **Recent advances in polymer-based drug delivery systems for local anesthetics.** *Acta Biomaterialia*. **91**, (2019) 1-30.
50. KASI, P. M.; PATNAIK, M. M.; PEETHAMBARAM, P. P. - **Case Report Safety of Pegfilgrastim (Neulasta) in Patients with Sickle Cell Trait/Anemia.** *Case Reports in Hematology*. **2013**, (2013) 1-4.
51. MISRA, H.; BERRYMAN, J.; JUBIN, R.; ABUCHOWSKI, A. - **A Phase I study to determine safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ANF-RHO™, a novel PEGylated granulocyte colony-stimulating factor, in healthy volunteers.** *Phase I Studies*. **36**, (2017) 75-84.
52. ROMEO, C.; LI, Q.; COPELAND, L. - **Severe pegfilgrastim-induced bone pain completely alleviated with loratadine: A case report.** *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. **21** (2014) 301-304.
53. DESHMUKH, A. S.; CHAUHAN, P. N.; NOOLVI, M. N.; CHATURVEDI, K.; GANGULY, K.; SHUKLA, S. S.; NADAGOUDA, M. N.; AMINABHAVI, T. M. - **Polymeric micelles: Basic research to clinical practice.** *International Journal of Pharmaceutics*. **532**, (2017) 249-268.
54. GUPTA, R.; SHEA, J.; SCAFE, C.; SHURLYGINA, A.; RAPOPORT, N. - **Polymeric**

- Micelles and nanoemulsions as drug carriers: Therapeutic efficacy, toxicity, and drug resistance.** *Journal of Controlled Release*. **212**, (2015) 70-77.
55. KAWAGUCHI, T.; HONDA, T.; NISHIHARA, M.; YAMAMOTO, T.; YOKOYAMA, M. - **Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats.** *Journal of Controlled Release*. **136**, (2009) 240-246.
56. YOKOYAMA, M. - **Polymeric micelles as drug carriers : their lights and shadows.** *Journal of Drug Targeting*. **7**, (2014) 576-583.
57. BERNABEU, E.; CAGEL, M.; LAGOMARSINO, E.; MORETTON, M.; CHIAPPETTA, D. A. - **Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead.** *International Journal of Pharmaceutics*. **526**, (2017) 474-495.