

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação toxicológica de nanocápsulas de núcleo lipídico e estudo da eficiência de nanocápsulas contendo melatonina na proteção frente ao dano causado pelo paraquat

MARIELE FEIFFER CHARÃO

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação toxicológica de nanocápsulas de núcleo lipídico e estudo da eficiência de nanocápsulas contendo melatonina na proteção frente ao dano causado pelo paraquat

Tese apresentada por **Mariele Feiffer Charão**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Solange Cristina Garcia

PORTO ALEGRE, 2015.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

Profa. Dra. Mirian Salvador

Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Prof. Dra. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Feiffer Charão, Mariele

Avaliação toxicológica de nanocápsulas de núcleo lipídico e estudo da eficiência de nanocápsulas contendo melatonina na proteção frente ao dano causado pelo paraquat / Mariele Feiffer Charão. -- 2015.

156 f.

Orientadora: Solange Cristina Garcia.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Paraquat. 2. Melatonina associada a nanocápsulas. 3. Nanotoxicologia. 4. Caenorhabditis elegans. 5. Estudos in vitro. I. Cristina Garcia, Solange, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos a CAPES, ao CNPq (PRONEX), ao PRONEM, à FAPERGS (PqG-2012), órgãos que financiaram a bolsa de estudos e o desenvolvimento deste trabalho; aos Laboratórios de Toxicologia (LATOX) e Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao laboratório GBToxCe da Faculdade de Farmácia da UNIPAMPA, necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força, serenidade e persistência para chegar a este objetivo.

À Prof. Dra. Solange por me inserir no mundo da pesquisa e me impulsionar e incentivar a permanecer nele por tantos anos, contribuindo com a minha formação científica. Também pelo exemplo de busca por resultados que possam contribuir para o bem da sociedade e correr atrás dos objetivos independente das adversidades. Muito obrigada pela confiança.

À Prof. Dra. Sílvia Guterres e Prof. Dra. Adriana Pohlmann pelo apoio, ensinamentos e oportunidade de trabalhar com a nanotecnologia.

À Prof. Dra. Vera Eifler-Lima pela cooperação e por permitir que pudéssemos montar toda a estrutura necessária no seu laboratório para o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof. Dra. Daiana Ávila e seu grupo de pesquisa GBToxCe, em especial a doutoranda Daiandra, pela oportunidade de trabalhar com o modelo *C. elegans*. Obrigada por terem me recebido tão bem na Unipampa Uruguaiana e por dividirem seus conhecimentos e por estarem sempre disponíveis para ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Tilman Grune e Dra. Daniela Weber pela atenção e apoio durante o período do doutorado sanduíche na Friedrich-Schiller Universität Jena.

Aos colegas e aos amigos do LATOX, que permanecem e aos que já por ele passaram que diretamente ou indiretamente auxiliaram e contribuíram com esse trabalho, Angela, Anelise, Bárbara, Bruna Dias, Bruna Gauer, Caroline, Elisa, Gabriela, Guilherme, Gustavo, Ingrid, Johana, Juliano, Louise, Marília, Natália, Rachel, Rafael, Sabrina, Yuri. Obrigada pelo convívio agradável, disponibilidade, apoio, amizade e por tornar os dias mais leves e divertidos em meio a tantos experimentos e prazos. Agradecimento especial para a minha IC Caroline que abraçou *C. elegans* junto comigo e que foi meu braço direito no desenvolvimento desse trabalho e também pela ajuda da Anelise na implementação desse modelo no nosso laboratório. À Bruna G., Bruna D., Gabi, Marília e Rafa que foram de suma importância para a realização dos experimentos *in vitro*. Sem o auxílio de vocês nada disso seria possível.

As minhas colegas e amigas Angela e Natália, pelos muitos anos de convívio, experiências trocadas, ajudas mútuas e que apesar de já terem deixado o LATOX, não deixaram de contribuir e me apoiar sempre que preciso foi. A Rachel que também de longe sempre esteve disponível para compartilhar seus conhecimentos comigo, obrigada pela amizade. Ao Guilherme que estava sempre disposto a ajudar, muito obrigada pelo seu auxílio. E muito obrigada aos atuais pós-graduandos do LATOX: Ane, Bruna, Elisa, Gabriela, Marília, Rafa e Sa por todo apoio, ajuda e períodos de descontração.

À Karina Paese e Denise Jornada pela incansável ajuda e por estarem sempre prontas para preparar mais um pouco de formulação. Obrigada por toda dedicação, ensinamentos e tempo disponível para sanar minhas dúvidas.

Aos meus pais Ivo e Ione, meus irmãos: Ivania, Léigide, Alex e Daniele, minha avó Matilde, meus sobrinhos amados Joan e Heitor, minha Tia Leca, meus cunhados e cunhada, meus sogros Eliane e Edevar, obrigada pelo apoio incondicional e por estarem sempre me incentivando e torcendo para que tudo desse certo.

Ao meu noivo, amigo, companheiro, parceiro Dedê. Obrigada meu amor por todo amor, incentivo, ajuda e paciência durante todos esses anos. Com certeza tua força e dedicação foram muito importantes para que eu chegasse até aqui e eu não poderia ter pessoa melhor para estar ao meu lado sempre.

Aos meus amigos de longa data e aos novos feitos em Porto Alegre obrigada pela amizade, momentos de descontração, carinho, apoio, incentivo, risadas e companheirismo.

Aos professores Flávia Thiesen, Mirian Salvador e Tiana Tasca por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese. Aos professores que compuseram a banca de qualificação Mirna Leal e Ruy Beck, que contribuíram com este trabalho.

Ao Programa da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de realizar o doutorado.

A CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho. Muito Obrigada!

RESUMO

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam-se que os agrotóxicos causam anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito. Dentre eles, o paraquat (PQ) é o que apresenta maior taxa de mortalidade, sendo responsável por cerca de 13% de todos os casos registrados, principalmente devido a falta de um tratamento efetivo. O principal mecanismo de toxicidade proposto está associado ao ciclo redox do PQ, onde ocorre a formação de espécies reativas (ERs) de oxigênio e nitrogênio, levando ao estresse oxidativo (EO). Na literatura há relatos do uso de antioxidantes para casos de intoxicação do PQ. Dessa maneira, nesse trabalho avaliou-se o uso de melatonina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico (Mel-LNC) na proteção contra os danos causados pelo PQ, uma vez que o uso da nanotecnologia melhorou a atividade antioxidante dessa molécula. Para tal utilizou-se o sistema *in vitro*, linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar (A549), e o modelo alternativo *in vivo*, *Caenorhabditis elegans*. Mel-LNC e nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) foram preparadas de acordo com o método de deposição do polímero pré-formado. Ambas as formulações foram caracterizadas avaliando tamanho de partícula, potencial zeta e pH, e para Mel-LNC foram determinadas a concentração de melatonina e porcentagem de encapsulação. Os resultados encontrados estão de acordo com os parâmetros já validados para essas formulações. Foi possível verificar que as formulações MEL-LNC e LNC se mantiveram estáveis nos meios de cultura utilizados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro* foi observado que o tratamento com ambas as formulações não causaram diminuição da viabilidade nem dano de DNA na linhagem celular utilizada. Além disso, foi verificado a internalização da Mel-LNC utilizando-se a formulação marcada com rodamina B, sendo possível verificar uma intensa fluorescência vermelha ao redor do núcleo da célula. O pré-tratamento com Mel-LNC foi capaz de aumentar a viabilidade celular e diminuir o dano oxidativo de DNA causado pelo paraquat após 24 horas de exposição, porém isso não ocorreu quando as células foram pré-tratadas com melatonina livre. No estudo com o modelo alternativo *C. elegans*, foi utilizada uma formulação de Mel-LNC marcada com rodamina B (Mel-LNC-RoB), a fim de verificar a absorção dessa formulação pelo nematoide. Foi possível observar que a internalização da Mel-LNC no *C. elegans* ocorre principalmente pela via oral, uma

vez que se verificou uma intensa fluorescência no intestino do nematoide após o tratamento com a Mel-LNC-RoB e após três horas, essa fluorescência se distribuiu pelo restante do corpo, apresentando inúmeros pontos de fluorescência fora do intestino. Com relação à avaliação do efeito protetor nesse modelo alternativo *in vivo*, pode-se inferir que o pré-tratamento com Mel-LNC aumentou a sobrevivência, diminuiu a produção de espécies reativas (ERs) e manteve o desenvolvimento normal dos nematoides após a exposição ao PQ, sendo que isso não foi verificado quando os mesmos foram pré-tratados com melatonina livre. Além disso, verificou-se que as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são seguras para o uso no modelo *C. elegans*, uma vez que apresentou alto valor para a dose letal 50 (DL₅₀), e alterações no desenvolvimento e produção de ERs somente ocorreram em doses mais elevadas que as utilizadas em nossos experimentos. Dessa maneira, a formulação de Mel-LNC mostrou-se um promissor candidato para estudos futuros nos casos de intoxicação por paraquat.

Palavras-chave: Paraquat, melatonina associada a nanocápsulas, nanotoxicologia, *Caenorhabditis elegans*, estudos *in vitro*.

ABSTRACT

Toxicological evaluation of lipid-core nanocapsules and efficacy study of melatonin-loaded nanocapsules on paraquat damage

According to estimations by World Health Organization (WHO), pesticides are responsible for 70 thousand acute intoxication cases that lead to death per year. Among these compounds, paraquat (PQ) presents the highest mortality rate, about 13% of all registered cases, especially for the lack of effective treatment. The major mechanism of toxicity proposed is associated to its redox cycle, in which oxygen and nitrogen reactive species (RS) are generated culminating in oxidative stress (OS). Some reports in the literature support the use of antioxidants for PQ intoxication cases. The present study aimed to evaluate the use of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules (Mel-LNC) in the protection against PQ-induced damages, considering that nanotechnology has improved the antioxidant activity of this molecule. For this purpose, an *in vitro* system composed by lung adenocarcinoma (A549) cell line, and the *in vivo* alternative model of *Caenorhabditis elegans* have been utilized. Mel-LNC and unloaded lipid-core nanocapsules were prepared by self-assembly and characterized by particle sizing, zeta potential and pH, and for Mel-LNC formulation it was determined the drug content and encapsulation efficiency. The results are in agreement with the parameters already validated for these formulations. It was possible verify that Mel-LNC and LNC formulations remained stable in the culture medium utilized in *in vitro* and *in vivo* experiments. Results from *in vitro* studies showed that none of the formulations induced reduction in cell viability or DNA damage in treated cells. Besides, it was observed the internalization of Mel-LNC marked with rhodamine B, showing an intense red fluorescence around the cell nucleus. Pretreatment with Mel-LNC was able to enhance cell viability and diminish DNA oxidative damage caused by paraquat after 24h exposure, which could not be observed when cells were pretreated with Mel. In the study with the alternative model *C. elegans*, a rhodamine (Ro)-linked Mel-LNC formulation was prepared in order to assess the absorption of the formulation by the nematode. Mel-LNC uptake in *C. elegans* was found to occur mainly by the oral route, once an intense fluorescence was observed in the intestine after treatment with Mel-LNC-RoB, which after 3h distributed to the rest of the body, presenting numerous fluorescence dots outside

the intestine. In relation to the evaluation of protection with the *in vivo* alternative model, results indicate that pretreatment with Mel-LNC increased survival rate, reduced the production of reactive species and maintained the normal development of nematodes after paraquat exposure, while the same observations were not found after pretreatment with free melatonin. In addition, the lipid-core nanocapsules (LNC) were found to be safe in the *C. elegans* model, due to its high lethal dose (LD₅₀) value, and development alterations and RS production only occurred in the higher doses than those utilized in our experiments. Therefore, the Mel-LNC formulation demonstrated to be a promising candidate for future studies aiming treatment of paraquat intoxication cases.

Keywords: paraquat; melatonin-loaded nanocapsules; nanotoxicology; *Caenorhabditis elegans*, *in vitro* study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do paraquat

Figura 2: Toxicocinética e toxicodinâmica do paraquat após exposição oral

Figura 3: Mecanismo de ação do paraquat

Figura 4: Estrutura química da melatonina

Figura 5: Representação esquemática das nanopartículas

Figura 6: Ciclo de vida do nematoide *C. elegans*

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNP	- Nanopartículas de prata
AgNP-PVP	- Nanopartículas de prata revestidas com polivinilpirrolidona
ANOVA	- Análise de variância
CAT	- Catalase
CGC	- Caenorhabditis Genetics Center
DAF-16	- Fator de transcrição homólogo a família FOXO em humanos
DCF	- Diclorofluoresceína
DCFH-DA	- Diclorofluoresceína diacetato
DL ₅₀	- Dose letal média para 50% da população teste
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
ERs	- Espécies Reativas
ERNs	- Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	- Espécies Reativas de Oxigênio
FOXO	- Família de proteínas sensoras das vias de sinalização da insulina
GSH	- Glutathiona Reduzida
GPx	- Glutathiona Peroxidase
GST	- Glutathiona Transferase
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HO-1	- Heme oxigenase
iNOs	- Enzima óxido nítrico sintase
LNC	- Nanocápsula de núcleo lipídico
LDH	- Lactato desidrogenase
Mel-LNC	- Melatonina incorporada a nanocápsulas
MTT	- Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NADP	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF κ -B	- Fator nuclear kappa B
NGM	- Nematode Growth Media
NO	- Óxido nítrico
NC	- Nanocápsula
NPs	- Nanopartículas
O ₂	- Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	- Radical superóxido
OH ⁻	- Radical hidroxila
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PQ	- Paraquat
PCL	- Poli- ϵ -caprolactona
PEG	- Polietilenoglicol
SiO ₂ -NP	- Nanopartícula de dióxido de Silício
SOD	- Superóxido Dismutase
TiO ₂ -NP	- Nanopartícula de óxido de titânio
TGI	- Trato gastrointestinal
ZnO-NP	- Nanopartícula de óxido de zinco

SUMÁRIO

PARTE I	21
INTRODUÇÃO	23
1. Paraquat	23
2. Antioxidantes	28
2.1. Melatonina	28
2.2 Nanocápsulas contendo melatonina	30
3. Nanotoxicologia	33
4. Uso de modelos alternativos para avaliação da eficácia terapêutica e toxicidade de nanopartículas	35
4.1 Estudos <i>in vitro</i>	36
4.2 Estudos <i>in vivo</i>	38
OBJETIVOS	43
1. Objetivo geral	43
2. Objetivos específicos	43
PARTE II	45
CAPÍTULO I	47
Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on cytotoxicity and genotoxicity induced by paraquat in pulmonary cell line	
CAPÍTULO II	87
<i>Caenorhabditis elegans</i> as an alternative <i>in vivo</i> model to determine oral uptake, nanotoxicity and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage	
PARTE III	133
DISCUSSÃO	135
CONCLUSÕES	143
PERPECTIVAS	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte para publicações e está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos; Parte II: Manuscritos 1 e 2; Parte III: Discussão, Conclusão, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho.

Os **Materiais, Métodos, Resultados e as Referências específicas** encontram-se no corpo de cada manuscrito, os quais estão apresentados na forma de **Capítulo I e II**.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos e que estão descritos nos capítulos.

A seção **Conclusão** aborda as conclusões gerais dos principais resultados da tese. Em seguida, está apresentada a seção **Perspectivas**, a qual aborda os próximos estudos a serem realizados.

A seção **Referências Bibliográficas** lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão da tese.

PARTE I

INTRODUÇÃO

1. Paraquat

O paraquat (PQ) foi sintetizado primeiramente em meados de 1882, porém a sua propriedade como herbicida só foi verificada em meados de 1960. A partir de então, seu uso disseminou-se por todo o mundo principalmente devido à sua baixa ação residual e possível uso para um vasto e diversificado número de culturas (BUS, AUST e GIBSON, 1975; YEH *et al.*, 2006).

O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) é um herbicida não seletivo, altamente efetivo e de ação rápida pertencente à classe dos bipyridílicos. É um composto quaternário de amônio que possui na sua estrutura dois anéis bipyridílicos unidos de maneira que os átomos de nitrogênio encontram-se em posição *para* (Figura 1) (YEH *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2012).

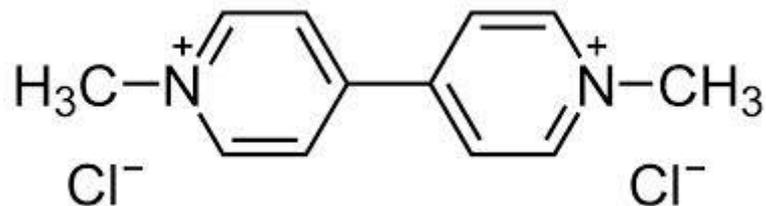


Figura 1: Estrutura química do paraquat

De acordo com dados publicados em 2013 no 'Centro de Informações sobre o Paraquat' (SYNGENTA, 2013), esse herbicida está registrado e é usado em mais de 90 países de todo o mundo, sendo comercializado para países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e ainda para países em desenvolvimento como Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai, entre outros. Porém o uso do paraquat foi banido de diversos países da União Européia além do Sri Lanka, Kuwait, Síria e Cambodja.

Em 2005, o paraquat foi classificado como agente tóxico de classe II (moderadamente perigoso), pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que o torna relativamente mais tóxico que outros herbicidas do mercado (WHO, 2005). Como pode ser visto o uso do paraquat ainda gera muitas controvérsias uma vez que existem relatos de que no Brasil existem inúmeros casos de intoxicação. No Rio

Grande do Sul, do total dos casos de intoxicação por agrotóxicos registrados entre 2009 e 2012, cerca de 40% foram intoxicações causadas por herbicidas e destes, cerca de 9% foram por paraquat (CIT, 2007), sendo que na grande maioria dos casos a intoxicação ocorre pela ingestão intencional do paraquat, com fins suicidas.

Mesmo apresentando baixos índices, a intoxicação por paraquat apresenta elevada taxa de mortalidade, sendo que 60-90% dos casos evoluem para óbito. Um dos motivos dos altos índices de casos fatais em intoxicações por paraquat é devido à falta de um antídoto específico e eficaz que seja capaz de reverter o quadro clínico do paciente (SUN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2013). Dessa maneira, o tratamento se baseia basicamente em três ações: prevenção da absorção, rápida excreção do paraquat absorvido e modificação dos efeitos teciduais causados pelo paraquat que foi absorvido e não eliminado (SCHMITT *et al.*, 2006).

O paraquat por ser um composto com uma alta polaridade não é absorvido quando em contato com a pele íntegra, porém quando em contato com a pele pode ocasionar queimaduras e dermatites (SUNTRES, 2002). Entretanto, exposições a grandes quantidades de herbicida e por um período prolongado de tempo provocam irritações e ulcerações na pele, causando necrose e levando a permeabilidade e absorção deste composto por essa via (GARNIER *et al.*, 1994). Quando em contato com os olhos, pode provocar irritação, queimaduras e lesão de retina (SUNTRES, 2002). A inalação do paraquat quando aplicado em spray raramente resulta em absorção sistêmica, uma vez que as gotículas produzidas pelos aparelhos de vaporização não atingem os alvéolos pulmonares, ocorrendo somente uma irritação local nas vias aéreas, porém a exposição por inalação ao paraquat em ambientes fechados, como por exemplo, em estufas, está associada a dano pulmonar (SUNTRES, 2002).

Apesar de relatos de intoxicações por via dérmica (ZHOU *et al.*, 2013; GE, WANG e SUN, 2014), aquelas resultantes da ingestão de paraquat (acidental ou intencional) são as mais relevantes e importantes do ponto de vista toxicológico. Quando ingerido, o paraquat causa diversos danos, dentre eles ulcerações oro-esofágicas e danos no trato gastrointestinal (TGI). Devido sua alta polaridade, somente 15% é absorvido no TGI, porém possui rápida absorção, atingindo seu pico plasmático em torno de 2-4 horas, sendo seu tempo de meia vida em torno de 5 horas (BISMUTH *et al.*, 1987) (Figura 2).

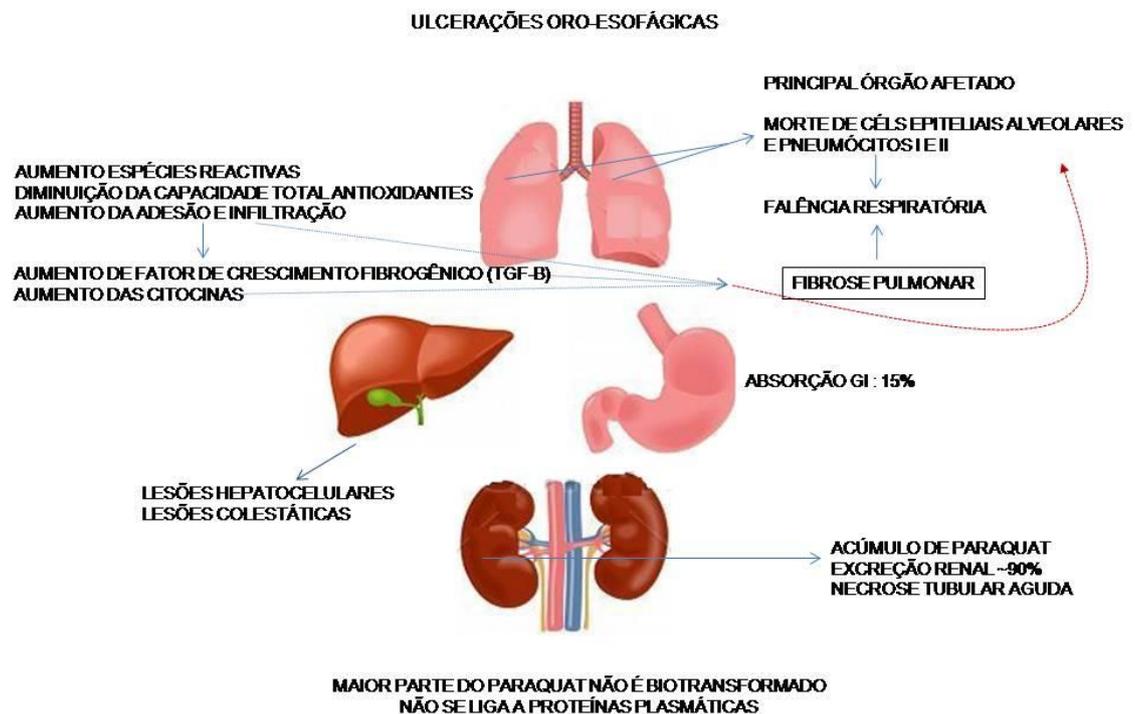


Figura 2: Toxicocinética e órgãos alvo do paraquat após exposição oral

Independente da via de exposição, o paraquat se distribui amplamente por vários órgãos como pulmões, rins, fígado, tecidos musculares, mas o acúmulo do herbicida ocorre principalmente nos seguintes tecidos: pulmonar, hepático e renal. No rim possui alta deposição por esse órgão ser o responsável pela sua eliminação (cerca de 90% da dose absorvida é eliminada pelo sistema renal) (WUNNAPUK *et al.*, 2014). Já o elevado acúmulo nos pulmões é devido à captura do paraquat pelas células epiteliais alveolares tipo I e II (via de captação das poliaminas) (YEH *et al.*, 2006; MITSOPOULOS e SUNTRES, 2010; ZERIN *et al.*, 2012). Esse processo ocorre devido à estrutura do paraquat ser similar a das poliaminas biogênicas (putrescina e espermidina) que são essenciais ao crescimento celular.

As primeiras manifestações clínicas após ingestão do paraquat são decorrentes da ação corrosiva desse herbicida sobre o trato digestivo, levando a lesões desde a cavidade oral até o trato gastrointestinal. O fígado é afetado na grande maioria dos indivíduos que ingerem grandes quantidades de paraquat, ocorrendo destruição de hepatócitos culminando com um quadro de icterícia que pode se instalar dentro de 24 horas. Uma vez que a principal via de excreção do

paraquat é renal, os danos nesse órgão também se instalam rapidamente (dentro de 48 horas), levando a diminuição da excreção de paraquat e necrose tubular. As manifestações pulmonares devido ao acúmulo de paraquat resultam em edema pulmonar, destruição brônquica e alveolar, e por último, fibrose pulmonar, que leva a falência respiratória (SUN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2013; TOYGAR *et al.*, 2014; WUNNAPUK *et al.*, 2014) (Figura 2).

Uma vez nas células, o paraquat exerce seus efeitos tóxicos principalmente ao entrar no ciclo de oxidação/redução, causando severo estresse oxidativo, ocorrendo o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HE *et al.*, 2012). Além disso, o paraquat age na indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que é responsável pela produção de óxido nítrico (NO) no organismo, sendo causa dos seus efeitos pró-inflamatórios e citotóxicos (GOCGELDI *et al.*, 2008; MORAN *et al.*, 2010; TOYGAR *et al.*, 2014).

Na porção citosólica, o paraquat reage com a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), substância doadora de elétrons, e ocorre a formação de paraquat monoradical cátion (MITSOPOULOS e SUNTRES, 2010). Esse radical reage espontaneamente com o oxigênio levando a formação de ânion superóxido e regenerando o paraquat original, o qual pode entrar no ciclo de oxidação/redução novamente, permanecendo no tecido por longos períodos de tempo. O ânion superóxido formado é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase que é então removido através da enzima catalase. O H_2O_2 também pode entrar na reação de Fenton, formando ânion hidroxila. O ânion superóxido leva à produção de outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) que causam morte celular através da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e dano de DNA (SUNTRES, 2002; YEH *et al.*, 2006; MITSOPOULOS e SUNTRES, 2010) (Figura 3).

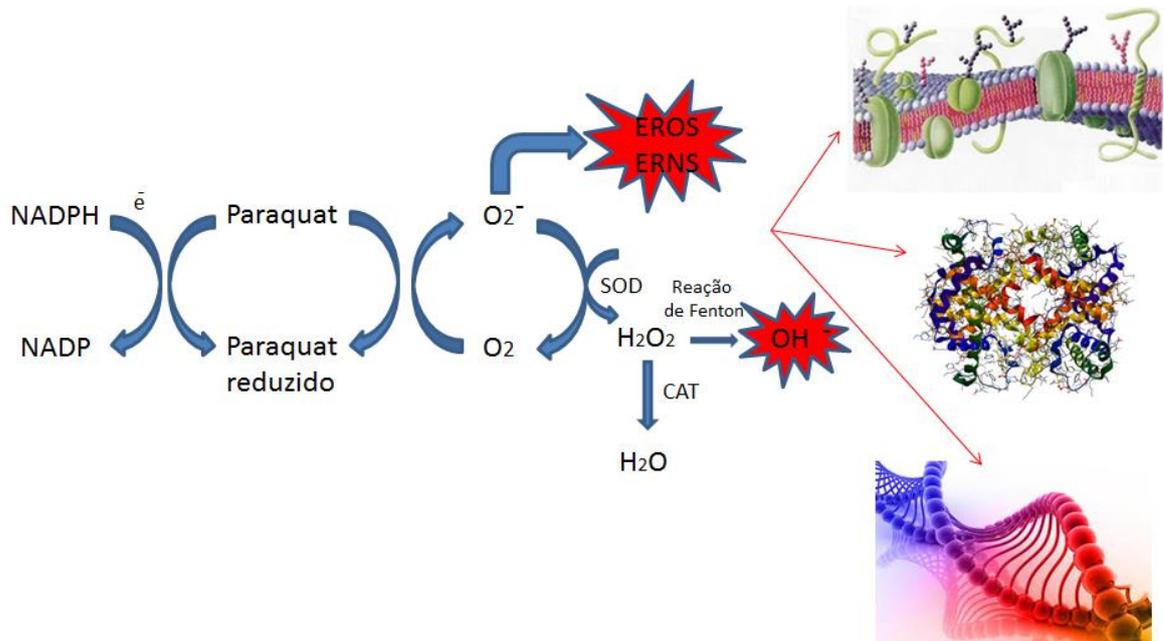


Figura 3: Mecanismo de ação do paraquat

(CAT: catalase; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; EROS: Espécies reativas de oxigênio; ERNS: Espécies reativas de nitrogênio; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; O₂⁻: radical superóxido; SOD: superóxido dismutase)

Até o presente momento, não há um tratamento efetivo e padronizado nos casos de intoxicações agudas por paraquat. Dessa maneira, terapias de suporte são utilizadas como estratégia para a modificação da toxicocinética do paraquat, diminuindo sua absorção ou aumentando a sua eliminação. Tais abordagens são realizadas com a intenção de prevenir a acumulação do paraquat nos tecidos e seus danos (SABZGHABAE *et al.*, 2010; GE, WANG e SUN, 2014).

Dentre os processos utilizados para a prevenção da absorção, utiliza-se a indução do vômito, lavagem gástrica, ou uso de substâncias adsorventes, como o carvão ativado e terra Füller (ANDRADE FILHO, CHARNIZON e AMARAL, 2013). A fim de aumentar a eliminação do paraquat, métodos como diurese forçada, hemoperfusão e hemodiálise são utilizados (SCHMITT *et al.*, 2006). Apesar de não haver um consenso no tratamento farmacoterapêutico frente a intoxicações agudas, o preconizado é o uso de imunossuppressores, anti-inflamatórios e antioxidantes como a vitamina C e E (SUNTRES, 2002; SCHMITT *et al.*, 2006).

Tendo em vista que o dano oxidativo e também o processo inflamatório possuem papel importante na toxicidade do paraquat, o tratamento com substâncias com potenciais propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias é uma ferramenta interessante na intoxicação por paraquat. Como o principal mecanismo é o aumento

na formação de ERs, substâncias exógenas que atuem sequestrando essas ERs e/ou ativando/inibindo fatores de transcrição responsáveis pela expressão de enzimas antioxidantes ou citocinas, se tornam importantes.

2. Antioxidantes

Uma vez que os efeitos tóxicos do paraquat são principalmente atribuídos ao ciclo redox que desencadeia a produção de ERs e subsequente dano oxidativo, é válido propor que alguns compostos com propriedades antioxidantes são uma alternativa terapêutica adequada, quer atuando diretamente sequestrando e diminuindo as ERs ou ativando respostas celulares tais como ativação do fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) (SUNTRES, 2002; BLANCO-AYALA, ANDERICA-ROMERO e PEDRAZA-CHAVERRI, 2014). Nrf2 é responsável pela regulação da expressão de uma variedade genes citoprotetores e detoxificantes (genes de fase II), levando a um aumento de enzimas como catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), heme oxigenase (HO-1) (BLANCO-AYALA, ANDERICA-ROMERO e PEDRAZA-CHAVERRI, 2014).

Dentre as substâncias antioxidantes relatadas na literatura, estudos com casos de pacientes intoxicados e em experimentos *in vivo* e *in vitro*, o uso de N-acetilcisteína, vitamina C, vitamina E, SOD veiculada a lipossomas, metalotioneína e glutathione (KIM *et al.*, 2010) mostraram uma redução no dano causado pela intoxicação por paraquat sendo que a melatonina foi considerada um promissor tratamento (SCHMITT *et al.*, 2006).

2.1. Melatonina

A melatonina foi isolada e caracterizada como um hormônio produzido pela glândula pineal no final da década de 50 do século XX (LERNER *et al.*, 1959). Está relacionada com o ritmo circadiano e à regulação fisiológica do organismo, atuando no ajuste e manutenção do relógio biológico. A melatonina é uma indolamina sintetizada a partir do neurotransmissor serotonina nos pinealócitos, onde a serotonina é acetilada a N-acetilserotonina, que posteriormente é o-metilada,

resultando na melatonina (REITER, 1991). Nos últimos anos, vários efeitos potenciais foram relatados para a melatonina, dentre eles, efeito sedativo, anticonvulsivante, analgésico, anticancerígeno, antioxidante, entre outros (COS *et al.*, 1998; KARBOWNIK, TAN e REITER, 2000; VIJAYALAXMI *et al.*, 2002; BRZEZINSKI *et al.*, 2005).

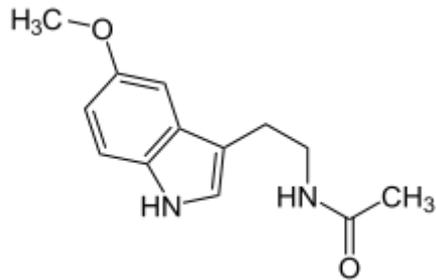


Figura 4: Estrutura química da melatonina

A propriedade antioxidante da melatonina está associada a dois mecanismos: a) capacidade de atuar sequestrando e reduzindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e b) sua atuação sobre a síntese de enzimas antioxidantes, sendo bastante efetiva contra a lipoperoxidação. Além disso, a melatonina age sobre a resposta inflamatória, diminuindo a expressão da iNOS e, conseqüentemente, a produção de óxido nítrico (REITER, TAN e OSUNA, *et al.*, 2000).

Vários estudos têm investigado o mecanismo de ação da melatonina contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Nesse contexto, estudos mostraram uma potente ação da melatonina agindo diretamente como sequestradora de radical hidroxil, radical ânion superóxido, radical monóxido de nitrogênio, oxigênio molecular (singlete), ânion peroxinitrito e peróxido de hidrogênio (REITER, TAN e OSUNA, *et al.*, 2000; REITER, TAN, QI, *et al.*, 2000; TAN *et al.*, 2002; TAN *et al.*, 2007). Sendo que o nitrogênio presente na estrutura química da melatonina, é um elemento importante e necessário para interagir com as EROs e ERNs (TAN *et al.*, 2007).

Devido a essas propriedades, pesquisas mostraram que o uso da melatonina pode ser útil nos casos de intoxicação aguda por paraquat (MELCHIORRI *et al.*, 1995; MELCHIORRI *et al.*, 1996; GOCGELDI *et al.*, 2008; SINGHAL *et al.*, 2011). Melchiorri e colaboradores (1995) observaram que o tratamento com melatonina foi

capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica e glutathiona oxidada no pulmão e fígado de ratos expostos ao paraquat, conferindo um efeito protetor contra o dano oxidativo causado pelo paraquat (MELCHIORRI *et al.*, 1995). Além disso, Gocgeldi e colaboradores (2008) verificaram que a administração da associação de melatonina e dexametasona foi mais eficaz que o tratamento somente com dexametasona, mostrando que a melatonina exibiu efeitos benéficos adicionais após a exposição dos ratos ao paraquat, diminuindo a taxa de mortalidade e melhorando parâmetros avaliados do estresse oxidativo (GOCGELDI *et al.*, 2008). Em estudo experimental em ratos com neuropatia diabética, foi verificado que a melatonina pode modular a neuroinflamação, diminuindo a ativação do NF κ -B, e o estresse oxidativo, aumentando a expressão de Nrf2, podendo assim ser a responsável em parte pelo efeito neuroprotetor na neuropatia diabética (NEGI, KUMAR e SHARMA, 2011).

Entretanto, a melatonina possui um curto tempo de meia vida (35 a 50 minutos), uma baixa e variada biodisponibilidade oral e é rapidamente metabolizada no fígado, onde é hidroxilada e conjugada ao sulfato formando a 6-sulfatoximelatonina pelo citocromo P450 (BENES *et al.*, 1997). Em função disso, sistemas de liberação controlada contendo melatonina para serem empregados por via oral, transdérmica, ou nasal, têm sido desenvolvidos, uma vez que é uma molécula com potencialidades terapêuticas (BENES *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2007). Dessa maneira, o uso de sistemas de liberação controlada utilizando a nanotecnologia se torna uma ferramenta útil.

2.2. Nanocápsulas contendo melatonina

A nanotecnologia envolve a manipulação de partículas com diâmetro que variam de 100 a 500 nm, variando seu tamanho de acordo com os constituintes presentes na formulação (ARORA, RAJWADE e PAKNIKAR, 2012). Através da manipulação de materiais de tamanho moleculares para criar novos produtos e processos com características inovadoras e devido às suas propriedades em nanoescala, a nanotecnologia desponta como líder para futuros negócios de base tecnológica e crescimento econômico em todo o mundo (KAY e SHAPIRA, 2009).

Dentre as aplicações da nanotecnologia, pode-se citar o uso de nanopartículas (NPs) para propósitos comerciais como o uso em cosméticos, microeletrônicos, aditivos alimentares, entre outros (LIU, 2006). Além do uso em

produtos de consumo, numerosas aplicações têm sido reportadas no campo biomédico, principalmente no segmento de imagens em diagnósticos, também em pesquisas biológicas, como na detecção de biomoléculas em ensaios de DNA, imunoenaios e bioimagem celular (LIU, 2006; GARCIA, 2010). Outra grande aplicação do campo nanotecnológico consiste nas novas formulações para o diagnóstico e tratamento do câncer, com o objetivo de aprimorar os métodos de detecção de tumores a aumentar a eficácia dos medicamentos utilizados atualmente (BRIGGER, DUBERNET e COUVREUR, 2002; FERRARI, 2005). Além disso, um promissor uso tem sido estudado para as NPs, como sistemas carreadores de fármacos para diferentes sítios de ação, entre eles o sistema nervoso central, permitindo a passagem pela barreira hematoencefálica (PATEL *et al.*, 2012). Também apresentam uma série de vantagens como melhora na biodisponibilidade de fármacos, redução da toxicidade de alguns medicamentos, além de melhora na atividade biológica de substâncias (BRIGGER, DUBERNET e COUVREUR, 2002; GUTERRES, SCHAFFAZICK e POHLMANN, 2007; FARAJI e WIPF, 2009; JAIN *et al.*, 2011; DIMER *et al.*, 2014). Como exemplos desses sistemas carreadores de fármacos, podemos citar as nanopartículas poliméricas (Mahapatro e Singh, 2011), que estão sendo estudadas para tratamento de câncer (BERNARDI *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009; ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2012), inflamações (FROZZA *et al.*, 2013), na dermatologia (RANCAN, BLUME-PEYTAVI e VOGT, 2014), entre outras aplicações.

As NPs poliméricas são colóides vesiculares ou matriciais contendo polímero como um domínio no sistema, com diâmetro abaixo de 1 μm , o qual varia de acordo com os constituintes presentes, bem como dos métodos de obtenção da formulação, sendo que os diâmetros médios compreendem a faixa de 100 a 500 nm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As NPs poliméricas podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas. As nanoesferas possuem uma matriz polimérica na qual o fármaco fica retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas por sua vez são vesículas carreadoras de fármacos formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo lipofílico (Figura 4). Um novo tipo de nanocápsulas, chamadas nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), são vesículas estruturadas por uma dispersão de um lipídio sólido e um lipídio líquido envolvidos por uma parede polimérica (VENTURINI *et al.*, 2011).

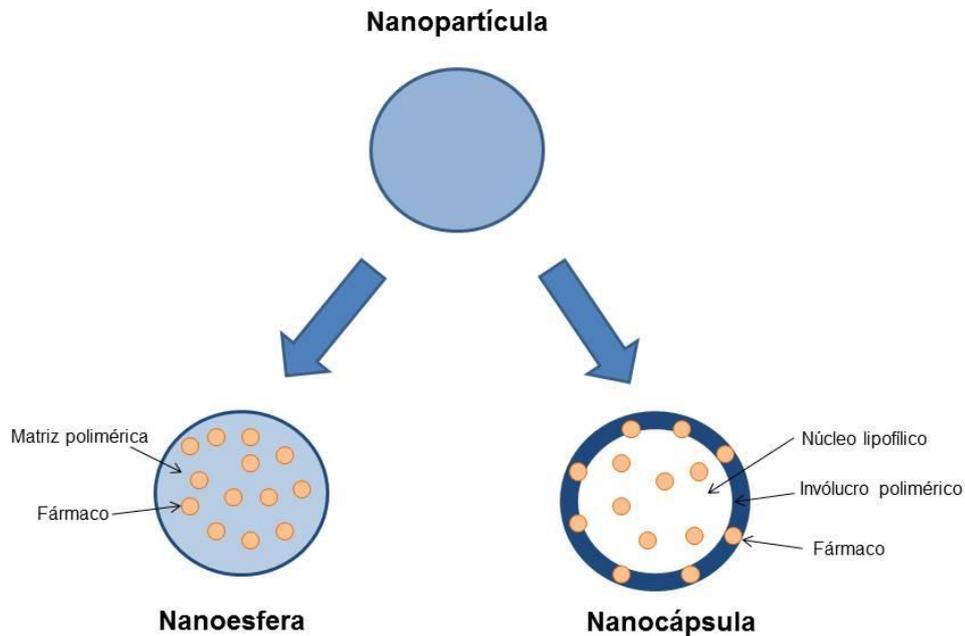


Figura 5: Representação esquemática das nanopartículas

Atualmente, utiliza-se em grande parte polímeros biodegradáveis para a aplicação de nanocápsulas poliméricas, sendo que o termo biodegradável significa que os polímeros sofrem degradação em moléculas que não são tóxicas e podem ser metabolizadas e eliminadas pelo organismo (RANCAN, BLUME-PEYTAVI e VOGT, 2014), e seu uso tem ganhado bastante atenção por se acreditar que é possível se obter um alto efeito com baixa toxicidade. Dentre os polímeros utilizados, formulações contendo a poli- ϵ -caprolactona (PCL) têm mostrado resultados promissores como carreadores de fármaco, além de melhora na atividade biológica de substâncias (CRUZ *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009; HAAS *et al.*, 2009; CATTANI *et al.*, 2010; FROZZA *et al.*, 2010; BERNARDI *et al.*, 2012)

Dessa maneira, devido às diversas aplicações terapêuticas descritas para a melatonina, principalmente em função de seu potente efeito antioxidante, foi desenvolvido estudo por Schaffazick e colaboradores (2003), onde foi realizada a incorporação da melatonina a diferentes nanocápsulas de núcleo lipídico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK, POHLMANN e GUTERRES, 2007). De acordo com os dados obtidos, foi possível verificar a obtenção de sistemas

nanoestruturados com os diferentes polímeros utilizados, sendo que em suspensão, a formulação que apresentou maior estabilidade foi aquela obtida com o uso do polímero PCL. A maior taxa de encapsulação foi verificada com o uso do polímero Eudragit® (56% de melatonina encapsulada), sendo que a taxa de encapsulação da formulação com PCL ficou em torno de 37% (SCHAFFAZICK, POHLMANN e GUTERRES, 2007). Por esta razão, estudos subsequentes foram realizados, utilizando melatonina incorporada a nanocápsulas utilizando Eudragit® como polímero, e foi verificada uma melhora na atividade biológica da melatonina, havendo aumento na capacidade antioxidante dessa formulação contra a peroxidação lipídica tanto *in vitro* como *in vivo* quando comparada a melatonina livre (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2008).

Porém, estudos da toxicidade de NPs biodegradáveis são importantes para garantir a segurança dessas formulações, preparadas com materiais biodegradáveis permitidos pela legislação vigente para uso na forma bulk ou em suspensão, mas que ainda devem ser reavaliados quando utilizados em nanotecnologia, principalmente quanto ao uso prolongado. Dessa maneira, uma nova subárea da toxicologia tem crescido nos últimos anos que é a nanotoxicologia (DONALDSON *et al.*, 2004).

3. Nanotoxicologia

Com o exponencial crescimento da nanotecnologia, a nanotoxicologia também vem crescendo, porém em um ritmo menos acelerado. A investigação sobre a segurança da nanotecnologia deve ser multidisciplinar, sendo que a nanotoxicologia é considerada uma subárea emergente e importante dentro desta ciência (OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER, 2007) e estudos de possíveis induções de respostas tóxicas resultantes das interações entre as nanoestruturas e os sistemas biológicos precisam ser investigados (DONALDSON *et al.*, 2004; FISCHER e CHAN, 2007).

Um dos primeiros estudos demonstrando potenciais efeitos prejudiciais de nanopartículas foi conduzido por Ferin e colaboradores (1992) e posteriormente foram corroborados por Oberdorster e colaboradores (1992) (FERIN, OBERDORSTER e PENNEY, 1992; OBERDORSTER, FERIN e MORROW, 1992).

Ambos verificaram que nanopartículas de TiO_2 de diferentes diâmetros se comportavam de maneira distinta em ratos expostos após instilação intratraqueal desses nanomateriais, ocorrendo um processo inflamatório pronunciado no pulmão dos animais expostos às nanopartículas de menor diâmetro, fato esse devido a grande área superficial das nanopartículas e sua interação com macrófagos alveolares e células intersticiais (FERIN, OBERDORSTER e PENNEY, 1992; OBERDORSTER, FERIN e MORROW, 1992). Os estudos de Oberdorster e Ferin (1992) levaram a um aumento no interesse sobre os efeitos das nanopartículas sobre o pulmão, bem como os possíveis efeitos e mecanismos que a exposição a NPs podem representar para as funções respiratórias e cardiovasculares (FERIN, OBERDORSTER e PENNEY, 1992; OBERDORSTER, FERIN e MORROW, 1992).

Após esses relatos, cresceu muito o interesse em avaliar os possíveis efeitos adversos de diferentes nanomateriais, tanto para a exposição humana como para o meio ambiente (OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER, 2005). Dessa forma, para o contínuo progresso da nanotecnologia é necessária à análise toxicológica dos materiais que estão sendo empregados. Esse crescimento acelerado despertou a atenção não só da comunidade científica e entidades reguladoras, como também da população em geral, para os possíveis efeitos tóxicos que esses novos materiais podem causar. Dessa maneira, Donaldson e colaboradores (2004), propuseram este novo conceito na área da toxicologia, a ideia de que as NPs comportam-se de maneira diferente dos materiais da mesma composição química, mas de maiores dimensões, sugerindo a criação desta nova área (DONALDSON *et al.*, 2004; MAYNARD, WARHEIT e PHILBERT, 2011).

O promissor uso de nanopartículas na área biomédica está aumentando o interesse sobre a nanotoxicologia, que tem se tornado um importante campo para avaliar a segurança desses novos compostos. Estudos na área toxicológica relatam dano oxidativo ou inflamatório induzido por nanomateriais, entre outros efeitos. Porém esses estudos raramente incluem as nanopartículas biodegradáveis, e quando é feita a avaliação da toxicidade, normalmente são utilizadas as nanopartículas ligadas a fármacos, sem avaliar o efeito da nanopartícula *per se* (GARCIA *et al.*, 2014).

Recentemente, Bulcão e colaboradores em estudos experimentais com ratos *wistar* realizou a avaliação da toxicidade de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) após a administração intraperitoneal e intradérmica, sendo observadas alterações de

peso que foram transitórias quando comparados com o grupo controle. Além disso, não houve alterações hepáticas e renais, nem dano oxidativo ou genotóxico, demonstrando que essas LNC não mostraram efeitos tóxicos quando administrados por essas vias (BULCAO *et al.*, 2013; BULCAO *et al.*, 2014).

Outro aspecto importante é a nanotecnologia depender, em parte, da exploração das propriedades específicas que os nanomateriais possuem e que são atribuídas ao seu pequeno tamanho (área superficial e distribuição de tamanho), composição química (pureza, cristalinidade, etc), estrutura superficial (reatividade, revestimentos orgânicos ou inorgânicos, etc), solubilidade, forma e agregação (Arora, Rajwade e Paknikar, 2012). Da mesma forma, as mesmas propriedades que levam a vantagens técnicas da nanotecnologia também podem levar a efeitos biológicos únicos de cada nanopartícula. O tamanho da nanopartícula pode fazer com que ela interaja e tenha uma captação maior com tecidos biológicos, além disso, devido à sua enorme reatividade química relacionada com a grande área superficial que apresentam em relação ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas podem gerar respostas biológicas adversas (FARIA, 2010; ARORA, RAJWADE e PAKNIKAR, 2012).

Assim, a nanotoxicologia estuda a compreensão completa da relação entre propriedades físico-químicas como tamanho de partícula, área superficial e reatividade, bem como dose (concentração), composição e potencial toxicidade das nanopartículas (ARORA, RAJWADE e PAKNIKAR, 2012). Portanto, é fundamental a caracterização física e química das NPs para estudos nanotoxicológicos, uma vez que é preciso avaliar corretamente os seus efeitos tóxicos, identificar as suas possíveis vias de exposição e prever os riscos relacionados com a sua síntese e utilização (MONTEIRO-RIVIERE e TRAN, 2007).

4. Uso de modelos alternativos para avaliação da eficácia terapêutica e toxicidade de nanopartículas

O desenvolvimento de métodos alternativos é baseado no conceito dos “3 Rs”, de Russell e Burch (1959): *Reduction, Refinement, Replacement*. Isto é, redução do número de animais em experimentação, refinamento dos procedimentos (diminuindo dor e estresse aos animais) e substituição de métodos animais por “não-animais” (*in vitro, ex vivo, in silico*) (RUSSEL e BURCH, 1959). É importante

observar que quando não é possível a substituição total do uso de animais, há de se levar em conta a possibilidade da redução e do refinamento da experimentação. Portanto, um método alternativo pode ser definido como qualquer método que tem por finalidade reduzir, refinar ou substituir o uso animal.

4.1. Estudos *In vitro*

Atualmente, a maior parte das avaliações terapêuticas e toxicológicas de NPs disponíveis na literatura científica está baseada em ensaios *in vitro*. Tal fato ocorre por serem testes rápidos, baratos e fáceis de serem executados (MARQUIS *et al.*, 2009), além disso, permitem a realização de estudos que comprovem o mecanismo de interação das NPs com as células. Algumas das vantagens do uso de sistemas *in vitro* incluem: 1) avaliação dos efeitos primários em células alvo; 2) identificação de mecanismos primários de toxicidade na ausência de fatores fisiológicos e compensatórios que confundem a interpretação em estudos com animais; 3) eficiência, rapidez e boa relação custo-benefício; e 4) possibilidades de melhoria nos desenhos experimentais subsequentes com animais, que são mais onerosos (HUANG, WU e ARONSTAM, 2010).

Estudos na avaliação de potenciais aplicações terapêuticas de diferentes substâncias incorporadas a nanocápsulas de núcleo lipídico, preparadas com PCL, são descritos na literatura. Resultados encontrados mostraram se tratar de um veículo promissor para o uso como carreadores de fármacos como anti-inflamatório indometacina (BERNARDI *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009), antimalárico quinina (HAAA *et al.*, 2009), e o antioxidante transresveratrol (FROZZA *et al.*, 2010). Também há relatos que algumas substâncias incorporadas a nanocápsulas de núcleo lipídico tiveram seu valor terapêutico aumentado, dentre elas o tamoxifeno (SHENOY e AMIJI, 2005), saquinavir (SHAH e AMIJI, 2006), insulina (DAMGE, MAINCENT e UBRICH, 2007; DE ARAUJO *et al.*, 2013), curcumina (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2012; CORADINI *et al.*, 2014) e melatonina (SCHAFFAZICK *et al.*, 2008). Além de redução na toxicidade de fármacos como doxorubicina (CAI *et al.*, 2010; PRAMANIK *et al.*, 2012) e olanzapina (DIMER *et al.*, 2014). Porém poucos trabalhos ainda tem como foco a avaliação da toxicidade dessas nanocápsulas *per se* (GARCIA *et al.*, 2014).

Liu e colaboradores (2012) verificaram que nanopartículas poliméricas de polietilenoglicol e PCL (PEG-PCL) não apresentam efeitos tóxicos na linhagem de carcinoma hepático H22 (LIU *et al.*, 2012). Porém, Qiu e colaboradores sugerem o uso de linhagens celulares normais para estudos nanotoxicológicos (QIU *et al.*, 2013). Nesse trabalho, foi verificado que nanopartículas de polifosfazeno modificadas por peguilação e pela adição de éster de metil serina apresentaram toxicidade em linhagem de hepatócitos normais (L-02), mostrando que essas nanopartículas não seriam promissoras para a aplicação como carreadores de fármacos, demonstrando a necessidade de se realizar testes de toxicidade *in vitro* previamente a testes com animais (QIU *et al.*, 2013).

Modelos *in vitro* permitem a possibilidade de investigar efeitos biológicos extensivamente em células específicas, o que não pode ser feito em modelos *in vivo*. Cultura celular humana e animal podem ser melhores controladas e com isso gerar resultados mais reprodutíveis que sistemas *in vivo*, porém é necessária uma padronização rígida desses ensaios *in vitro* para maximizar a reprodutibilidade (CLIFT, GEHR e ROTHEN-RUTISHAUSER, 2011; ARORA, RAJWADE e PAKNIKAR, 2012).

Atualmente, vários trabalhos têm relatado a questão de interferência metodológica em estudos *in vitro* com NPs (CLIFT, GEHR e ROTHEN-RUTISHAUSER, 2011; KROLL *et al.*, 2012). Estudos recentes sugerem que ensaios *in vitro* comumente usados podem não prover dados reais uma vez que as NPs podem interagir com componentes do ensaio e também nas leituras ópticas. Devido a sua grande área superficial e alta energia de superfície, as NPs podem adsorver reagentes do ensaio ou corantes de marcação, distorcendo assim o resultado do ensaio. Outro fator importante é a absorvância óptica intrínseca de dispersões de NPs, uma vez que a maioria dos ensaios *in vitro* clássicos, como ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), lactato desidrogenase (LDH), diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) são baseados em leituras ópticas, a alta absorção ou espalhamento de luz das NPs podem interferir com o método de detecção (KROLL *et al.*, 2012).

Há relatos que nanotubos de carbono adsorvem o composto MTT-formazan, composto formado no ensaio do MTT. Além disso, esses compostos também são capazes de adsorver nutrientes essenciais do meio de cultura, resultando em efeitos citotóxicos indiretos. Em ambos os casos, a alta capacidade de adsorção dos

nanotubos de carbono gera resultados falso-positivos, superestimando a sua toxicidade (CASEY *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2008). Kroll e colaboradores (2012) verificaram a possível interferência de 24 nanopartículas em ensaios clássicos de citotoxicidade, dentre eles o ensaio de produção de espécies reativas (DCFH-DA), atividade metabólica (MTT), e morte celular (LDH). Foi observado interferência dose-dependente nos três métodos avaliados. Além disso, para os ensaios de MTT e DCFH-DA, adaptações como lavagens após o tratamento e antes da adição dos reagentes MTT e DCFH-DA, mostraram reduzir a interferência metodológica (KROLL *et al.*, 2012).

Dessa maneira, antes de utilizar ensaios *in vitro* clássicos com nanopartículas é preciso verificar possíveis interferências, a fim de evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Assim, esses ensaios precisam ser melhor desenvolvidos, validados para cada tipo de NP e restritos a concentrações abaixo daquelas que se verifica interferência com o aumento da concentração.

4.2. Estudos *in vivo*: *Caenorhabditis elegans*

Nos últimos anos, um modelo alternativo e bem caracterizado tem sido de grande relevância para avaliar substâncias benéficas e tóxicas ao organismo bem como para identificar novos alvos para intervenções farmacológicas, o nematóide *Caenorhabditis elegans*. Trata-se de um nematóide de vida livre, encontrado na porção líquida do solo e comum em todo o mundo (SCHIERENBERG e WOOD, 1985). É um organismo bem caracterizado, tendo o genoma completo mapeado, tornando-se o primeiro eucarionte pluricelular a ter o genoma sequenciado, com 97 milhões de pares de bases (BRENNER, 1974; AVILA *et al.*, 2012).

Muitos são os fatores que levam a escolha desse modelo alternativo para ensaios biológicos, dentre eles a forte correlação entre o *C. elegans* e os mamíferos em princípios celulares e moleculares, sendo que 60 a 80% dos genes humanos possuem homólogos no *C. elegans*, ser de fácil cultivo e possuir um ciclo de vida curto (dois dias), sendo que o tempo de vida da cepa tipo selvagem é de aproximadamente 3 semanas (GAMI e WOLKOW, 2006). Eles são predominantemente hermafroditas, sendo que sua reprodução é por autofecundação, o que permite que a população seja mantida efetivamente isogênica. O hermafrodita grávido expela o ovo e após sua eclosão, passa por

quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (Figura 4). Os hermafroditas adultos se autofecundam, iniciando um novo ciclo de vida. Além disso, o *C. elegans* apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, pois ele é um organismo multicelular que permite que a ação dos compostos seja avaliada de uma forma sistêmica, em um organismo (KALETTA e HENGARTNER, 2006).

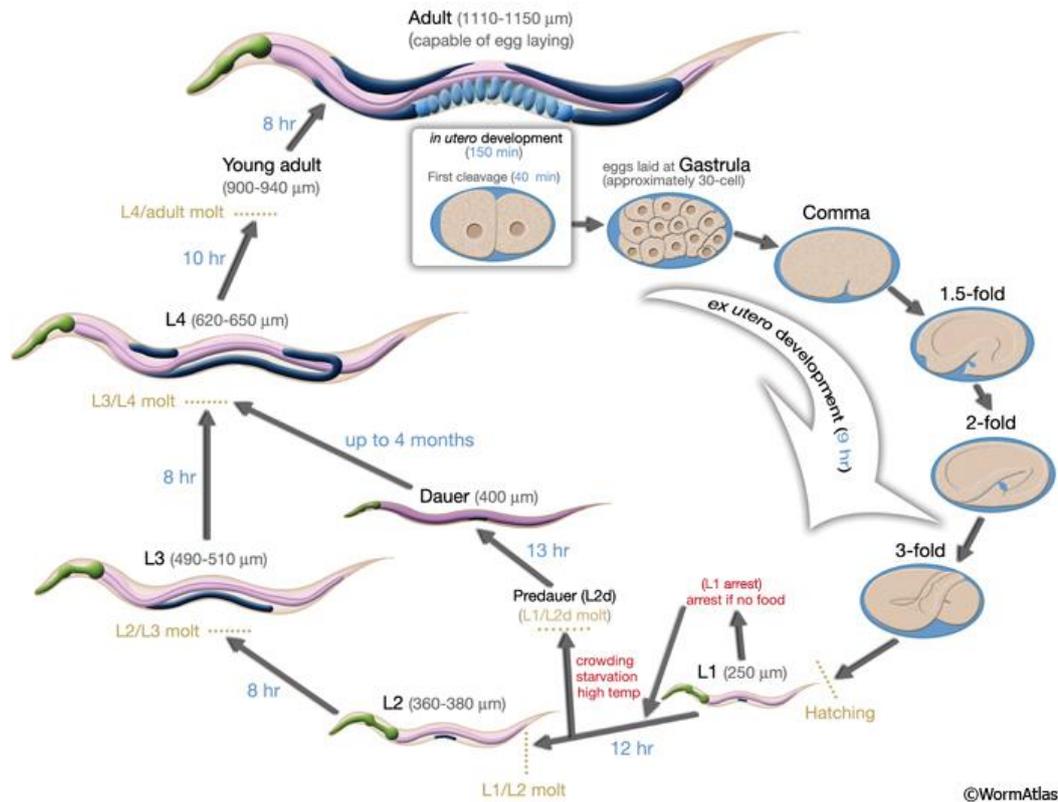


Figura 6: Ciclo de vida do nematoide *C. elegans* (WormAtlas)

Outra vantagem é que, devido a sua pequena dimensão, permite a realização de ensaios em placas de poliestireno e, por ser um nematoide transparente, marcadores fluorescentes, como por exemplo, genes repórteres, podem ser observados nos animais vivos. Assim, o fato do seu genoma já ser conhecido e da disponibilidade de mutantes para a maioria dos seus genes, o *C. elegans*, permite que os mecanismos da resposta ao estresse sejam facilmente investigados *in vivo* (KALETTA e HENGARTNER, 2006).

Recentemente, o nematoide *C. elegans* têm sido empregado em estudos de nanotoxicologia. Dentre os ensaios de toxicidade avaliados está a dose letal (DL_{50}), que corresponde à concentração da substância capaz de matar 50% dos nematoides expostos; análise comportamental, que está relacionada com a avaliação da neurotoxicidade; produção de espécies reativas, através do ensaio da

produção de DCF; avaliação do desenvolvimento, através da medida da superfície corporal dos nematoides; diminuição da expressão gênica de enzimas antioxidantes; entre outros (ROH, LEE e CHOI, 2006; SHEN *et al.*, 2009; WANG, WICK e XING, 2009; ELLEGAARD-JENSEN, JESEN e JOHANSEN, 2012; KIM, NAM e AN, 2012; LI *et al.*, 2012; TSYUSKO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014). Dentre esses estudos, Ellegaard-Jensen e colaboradores (2012) verificaram a importância de se verificar a estabilidade e possível aglomeração das nanopartículas quando em contato com o meio de tratamento, enfatizando novamente a importância de se caracterizar as nanopartículas previamente a realização dos ensaios biológicos (ELLEGAARD-JENSEN, JENSEN e JOHANSEN, 2012).

Li e colaboradores verificaram que a exposição crônica a nanopartículas de Al_2O_3 em *C. elegans* causou severo dano oxidativo, com aumento de produção de espécies reativas e desequilíbrio da defesa antioxidante quando comparado com a forma *bulk*. A grande área superficial das nanopartículas comparada com a forma *bulk* pode ser um dos motivos para explicar essa diferença de toxicidade (LI *et al.*, 2012). Em outro estudo com nanopartículas de óxido metálicas (TiO_2 -NPs, ZnO-NPs, and SiO_2 -NPs) foi observado que a exposição a altas doses das NPs metálicas levou a efeitos adversos, causando aumento na mortalidade dos nematoides, afetando também o seu desenvolvimento e reprodução. Porém em doses baixas já foi verificado um aumento na produção de espécies reativas (QIU *et al.*, 2013).

Recentemente, Ahn e colaboradores (2014) verificaram que o revestimento das nanopartículas e seu tamanho têm influência direta sobre a toxicidade em *C. elegans*. Neste estudo foi verificado que ao revestir as nanopartículas de prata com polivinilpirrolidona (AgNP-PVP) houve uma redução significativa da toxicidade das nanopartículas quando comparadas com as sem revestimento (AgNP). Além disso, eles também observaram um aumento na toxicidade das nanopartículas de menor tamanho, aumento do dano oxidativo ao DNA e indução de dano da membrana mitocondrial nos nematoides expostos a nanopartículas sem revestimento e as AgNP-PVP de menor diâmetro (AHN *et al.*, 2014). Isto também foi verificado em outro estudo semelhante utilizando *C. elegans*, em que ocorreram alterações físico-químicas das AgNP, mudança na captação das NP pelos nematoides e redução no dano celular causado quando essas NP eram revestidas com material orgânico natural (YANG *et al.*, 2014).

Além de estudos de toxicidade, esse modelo alternativo também tem sido usado para avaliar efeitos benéficos de novas formulações, como o caso de um recente trabalho em que foi verificado que resveratrol associado a copolímeros biodegradáveis (metoxi-polietilenoglicol-poli-caprolactona - PEG-PCL), melhorou a atividade antioxidante do resveratrol, sendo capaz de proteger os nematoides de danos causados pela radiação de raios- γ , aumentando o sequestro de espécies reativas através do aumento da expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase. Porém nada foi relatado com relação à avaliação da toxicidade dessas nanopartículas poliméricas *per se*, o que é um dado de extrema relevância, visto que é importante dados com relação à segurança desses novos nanomateriais que são fabricados (YIN *et al.*, 2014).

Estudos com relação à terapêutica de substâncias associadas a nanocápsulas biodegradáveis, bem como a toxicidade dessas nanocápsulas *per se* utilizando modelo alternativo *in vivo* *C. elegans* ainda são escassos. Dessa maneira, nesse trabalho além da utilização de modelo *in vitro* usando a linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar (A549), foi utilizado o nematoide *C. elegans* para avaliação da formulação de melatonina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico na proteção contra os danos causados pelo paraquat, bem com a avaliação da toxicidade dessas nanocápsulas *per se* no modelo alternativo *C. elegans*.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito protetor da melatonina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico utilizando modelos alternativos *in vitro*, com a linhagem celular A549 e *in vivo*, através do nematoide *Caenorhabditis elegans*. Além disso, verificar a toxicidade das nanocápsulas biodegradáveis *per se* no modelo alternativo *C. elegans*.

2. Objetivos específicos

- ❖ Avaliar *in vitro*, na linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar (A549), a viabilidade celular após tratamento com paraquat em diferentes concentrações e tempos, através do ensaio do MTT;
- ❖ Avaliar *in vitro* se o pré-tratamento com a formulação de melatonina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico (Mel-LNC) é capaz de aumentar a viabilidade celular após tratamento com paraquat em comparação com a melatonina em solução;
- ❖ Avaliar *in vitro* se a formulação de Mel-LNC é capaz de proteger contra os efeitos genotóxicos causados pelo paraquat, através do ensaio cometa, em comparação com a melatonina em solução;
- ❖ Avaliar a captação e distribuição da formulação Mel-LNC marcada com rodamina (Mel-LNC-Ro) no modelo alternativo *in vivo* *C. elegans*;
- ❖ Verificar se a formulação Mel-LNC é capaz de proteger os nematoides dos danos causados pela exposição ao paraquat. Avaliando os nematoides pré-tratados com nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), Mel-LNC e melatonina livre, através de testes como avaliação da sobrevivência, produção de espécies reativas e avaliação do desenvolvimento;
- ❖ Investigar a toxicidade das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) no modelo *C. elegans*, através da avaliação de testes de toxicidade bem definidos neste modelo: dose letal (DL₅₀), produção de espécies reativas e avaliação do desenvolvimento;

PARTE II

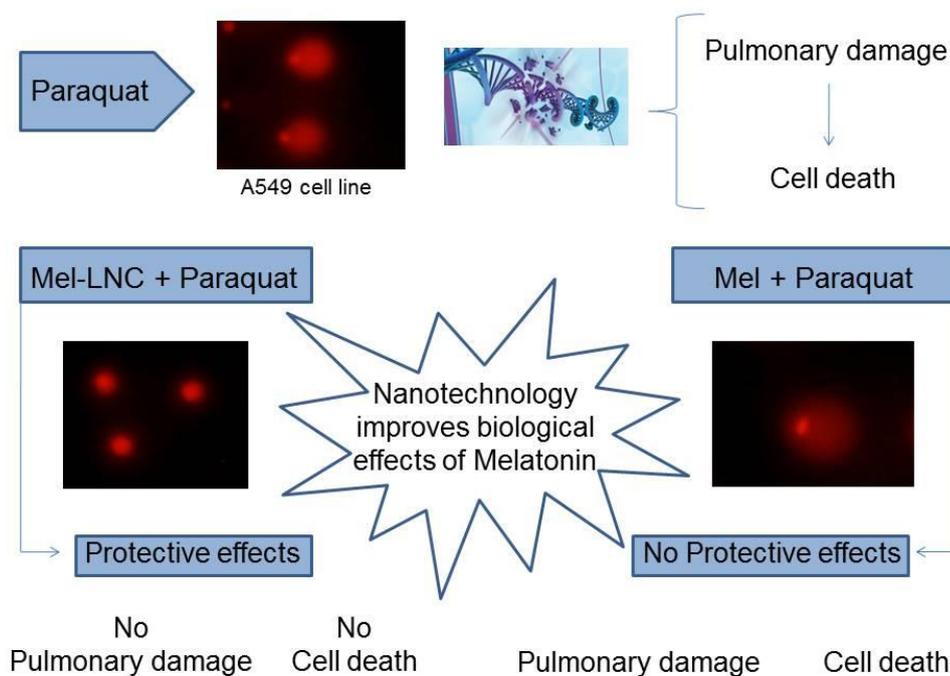
CAPÍTULO I

Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on cytotoxicity and genotoxicity induced by paraquat in pulmonary cell line

Mariele F. Charão, Marília Baierle, Bruna Gauer, Gabriela Goethel Rafael Fracasso, Karina Paese, Natália Brucker, Angela M. Moro, Guilherme B. Bubols, Bruna B. Dias, Ursula S. Matte, Silvia S. Guterres, Adriana R. Pohlmann, Solange C. Garcia

Manuscrito submetido para a revista *Mutation Research*

Graphical Abstract



As seguintes páginas (49-85) foram excluídas, pois correspondem ao manuscrito submetido para publicação no periódico Mutation Research.

Muitas intoxicações agudas permanecem sem antídoto. Dentre elas, o paraquat é um herbicida utilizado em muitos países, sendo responsável por milhares de morte (intencional ou acidental), principalmente por fibrose pulmonar. Melatonina quando incorporada a nanocápsulas de núcleo lipídico (Mel-LNC) apresenta propriedades antioxidantes melhoras, entretanto essa formulação não foi ainda estudada no contexto da citotoxicidade e dano de DNA em células expostas ao paraquat. Neste estudo foi avaliado se a formulação Mel-LNC é capaz de proteger as células epiteliais alveolares (A549) da citotoxicidade e dano oxidativo de DNA causado pelo paraquat. Além disso, verificar a internalização celular na linhagem A459 utilizada neste estudo através da utilização de uma formulação marcada com rodamina-B (Mel-LNC-RoB).

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que após três e 24 horas após o tratamento houve a internalização da formulação na linhagem celular A549, sendo observada uma intensa fluorescência vermelha ao redor do núcleo celular. Melatonina em solução, Mel-LNC e LNC não mostraram citotoxicidade e genotoxicidade nas células A549. O pré-tratamento com Mel-LNC foi capaz de proteger as células da citotoxicidade e genotoxicidade induzida pelo paraquat, sendo que isso não foi observado quando as células foram pré-tratadas com melatonina livre. Além disso, o paraquat induziu dano oxidativo de DNA, sendo observado um aumento significativo do dano de DNA verificado pelo ensaio cometa modificado. Mel-LNC protegeu as células do dano oxidativo induzido pelo paraquat, sendo mais efetiva que a melatonina livre. Dessa maneira, o uso de substâncias com propriedades melhoradas devido a nanotecnologia é uma escolha interessante para estudos futuros em intoxicação por paraquat.

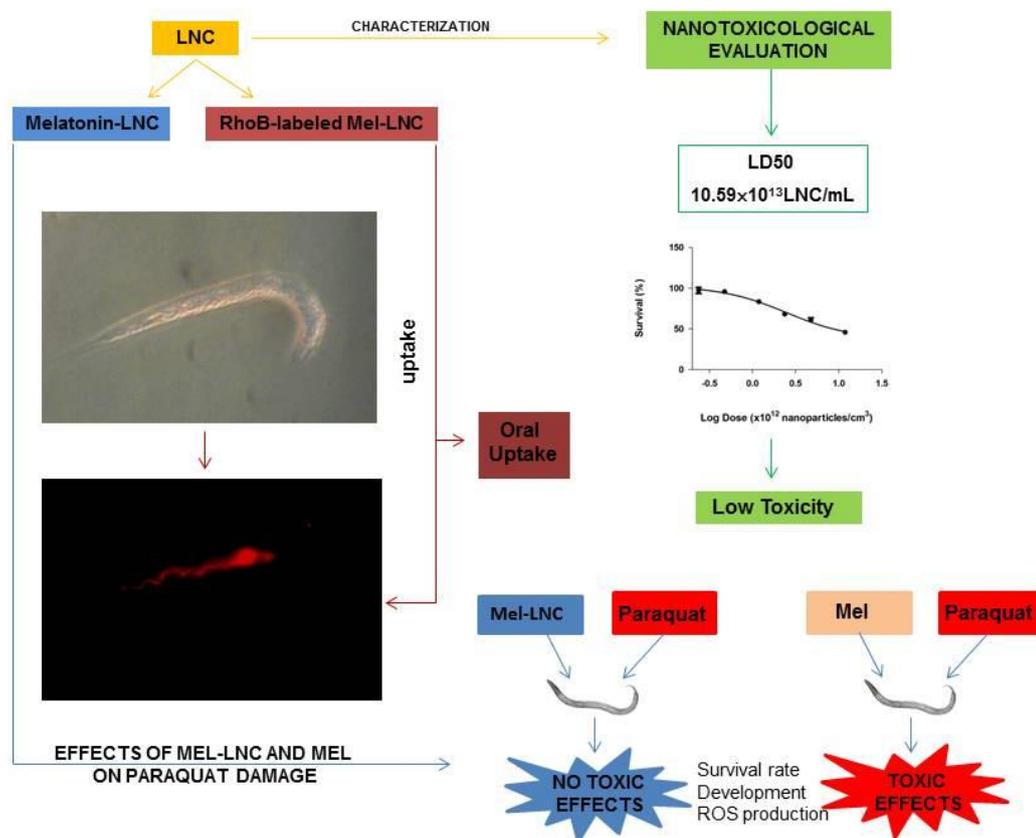
CAPÍTULO II

***Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage**

Mariele Feiffer Charão, Caroline Souto, Natália Brucker, Anelise Barth, Denise Soledade Jornada, Daiandra Fagundez, Daiana Silva de Ávila, Vera L. Eifler-Lima, Silvia S. Guterres, Adriana Raffin Pohlmann, Solange Cristina Garcia

Manuscrito submetido para a revista *Journal of Nanomedicine*

Graphical Abstract



As seguintes páginas (89-131) foram excluídas, pois correspondem ao manuscrito submetido para publicação no periódico Journal of Biomedical Nanotechnology.

O uso de nanocápsulas poliméricas tem mostrado resultados promissores como *drug delivery*. Porém, essas formulações nunca foram usadas no campo toxicológico como possíveis antídotos, como nos casos de intoxicação por paraquat. Assim, o uso de substâncias com propriedades melhoradas através do uso da nanotecnologia é uma ferramenta interessante para proteger dos efeitos tóxicos causados pelo paraquat. *Caenorhabditis elegans* é um modelo alternativo *in vivo* que tem ganhado bastante destaque no meio científico para estudos farmacológicos e toxicológicos.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a formulação de melatonina associada a nanocápsulas (Mel-LNC) marcada com rodamina-B é absorvida pelo nematoide *C. elegans*, se Mel-LNC é capaz de proteger os nematoides dos danos causados pelo paraquat e se esse modelo é útil para avaliação nanotoxicológica.

Os resultados demonstraram que a formulação é absorvida principalmente pela via oral, sendo possível verificar intensa fluorescência no intestino e posteriormente é distribuída no corpo do nematoide. Pré-tratamento com Mel-LNC aumenta significativamente a sobrevivências dos nematoides, reduz a produção de espécies reativas e mantém o desenvolvimento normal dos nematoides expostos ao paraquat comparados com aqueles tratados com paraquat ou pré-tratados com melatonina livre. Além disso, a avaliação da toxicidade das nanocápsulas brancas mostrou que essa formulação é segura nesse modelo utilizado. Assim, o modelo *C. elegans* mostrou ser um modelo alternativo interessante tanto para avaliar a eficácia como toxicidade de nanocápsulas.

PARTE III

DISCUSSÃO

O paraquat é considerado uma substância extremamente tóxica, responsável por altas taxas de mortalidade, sendo que a principal causa de morte é insuficiência respiratória devido à fibrose pulmonar (KANG *et al.*, 2013). A alta taxa de mortalidade é devida, em grande parte, a falta de um antídoto eficaz. Quando em contato com as células, o paraquat pode ser reduzido pela enzima NADPH-citocromo P450 reductase, com a transferência de um elétron, formando o radical paraquat. Este, por sua vez, em presença de oxigênio oxida-se rapidamente produzindo um ânion radical superóxido e regenerando o paraquat. Dessa maneira, ele participa de ciclos repetidos de redução e oxidação, podendo gerar uma grande quantidade de espécies reativas que levam o organismo ao estresse oxidativo, causando danos em proteínas, lipídios e DNA (KANG *et al.*, 2013; RANJBAR, 2014; TOYGAR *et al.*, 2014).

Nesse trabalho foi verificado, através dos estudos *in vitro*, utilizando a linhagem celular A549, que o pré-tratamento com melatonina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico (Mel-LNC) foi capaz de proteger as células da citotoxicidade celular, além de reduzir significativamente o dano causado ao DNA após tratamento com paraquat. Além disso, foram observados nos experimentos *in vivo* utilizando o modelo *C. elegans*, que a Mel-LNC foi capaz de proteger o *C. elegans* frente a exposição ao paraquat, fato esse não observado nos nematoides tratados com melatonina livre.

A melatonina é um neurohormônio secretado principalmente pela glândula pineal, sendo que sua principal função está relacionada com a regulação do ciclo circadiano (REITER, 1991). Além disso, estudos indicam que a melatonina é um antioxidante mais potente que a vitamina C e E, por exemplo, isso porque a melatonina quando sequestra RLs entra em uma reação em cascata que forma metabólitos resultantes da interação entre a melatonina e as EROs e ERNs (VIELMA *et al.*, 2014). Estes metabólitos e a melatonina são capazes de sequestrar até dez RLs, enquanto outros antioxidantes como a vitamina C e E, e glutathione são capazes de sequestrar um RL por molécula (TAN *et al.*, 2007).

Uma vez que a melatonina apresenta curto tempo de meia-vida e por se tratar de uma molécula com potencialidades terapêuticas, sistemas de liberação controlada contendo melatonina têm sido desenvolvidos. Schaffazick e colaboradores (2007) desenvolveram uma formulação contendo melatonina associada a LNC, utilizando Eudragit como polímero, a fim de obter melhora da biodisponibilidade da melatonina (SCHAFFAZICK, POHLMAN e GUTERRES, 2007). Além da função de liberação controlada, foi verificada melhora na atividade biológica da melatonina quando associada a nanocápsulas, havendo aumento na capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (SCHAFFAZICK et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2008). Apesar do provado efeito antioxidante, optamos por utilizar a formulação preparada com o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), por já ter sido realizado, pelo nosso grupo de pesquisa, estudo com relação à toxicidade *in vivo* de nanocápsulas utilizando PCL como polímero (BULCAO et al., 2013; BULCAO et al., 2014).

É importante ressaltar que para o entendimento e aplicação clínica de nanocápsulas, estudos de toxicidade e biocompatibilidade são necessários (OBERDORSTER, OBERDORSTER e OBERDORSTER, 2005). Quando se trata de estudos de nanotoxicologia, primeiramente é necessário fazer a adequada caracterização das nanopartículas, sendo de extrema importância dados com relação a sua constituição, tamanho, número de partículas/ml, potencial zeta, pH, entre outros. Sendo que a variação nessas características físico-químicas é responsável pela variação da toxicidade de inúmeros nanomateriais (DHAWAN e SHARMA, 2010).

Neste estudo, as suspensões de melatonina incorporadas a nanocápsulas (Mel-LNC), Mel-LNC marcada com rodamina e nanocápsulas sem melatonina (branca) foram preparadas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As suspensões foram devidamente caracterizadas quanto ao pH, IPD, potencial zeta, tamanho de partícula, distribuição de tamanho, número de partículas/ml, e porcentagem de encapsulação da melatonina. Os resultados estão de acordo com dados anteriores da literatura avaliando estas mesmas formulações, visto que se trata de um método previamente otimizado e validado (SCHAFFAZICK, POHLMANN e GUTERRES, 2007; VENTURINI et al., 2011). Além disso, foi verificado se o meio utilizado nos experimentos poderia causar aglomeração das

nanocápsulas. Nesse trabalho foi observado que o meio M9, utilizado para o tratamento no modelo *C. elegans*, e meio Ham F-12, utilizado para a cultura celular, não levaram a aglomeração das nanocápsulas nas formulações, mantendo o mesmo tamanho de partícula.

Como já foi relatado acima, o processo de nanoencapsulação da melatonina melhorou sua propriedade antioxidante e uma vez que o principal mecanismo de toxicidade do paraquat é devido ao estresse oxidativo, foi escolhida essa formulação para avaliar um possível efeito protetor frente à exposição ao paraquat. Entretanto é necessário haver a internalização das nanocápsulas para as células a fim de exercer seus efeitos. Dessa maneira, foi utilizada a formulação de Mel-LNC marcada com rodamina para verificar se as nanocápsulas são internalizadas na linhagem celular A549. De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar uma intensa fluorescência vermelha ao redor do núcleo das células, confirmando a sua internalização nessa linhagem celular. Foi observado que a viabilidade celular das células A549 com paraquat diminuiu de maneira dose dependente. Além disso, não houve dano celular quando as células foram tratadas com as formulações de Mel-LNC e melatonina livre na concentração de 10 µg/mL. Para posteriores testes, foi utilizada a concentração onde havia a diminuição em torno de 40% da viabilidade celular após o tratamento com paraquat. Foi possível verificar que o pré-tratamento com Mel-LNC foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular após o tratamento com paraquat, sendo que a melatonina livre não foi capaz de aumentar a viabilidade, avaliação esta realizada através do ensaio do MTT.

Para o ensaio cometa, foi utilizada a concentração de paraquat de 100 µM, uma vez que o intuito do trabalho era verificar o possível dano antes de ocorrer a morte celular. Após 24 horas de tratamento foi possível verificar que o paraquat causou aumento na genotoxicidade, indicado pelo aumento na porcentagem de DNA na cauda, avaliado pelo ensaio cometa. Além disso, foi possível verificar o dano oxidativo causado, sendo verificado aumento na % DNA na cauda ao se realizar o teste cometa modificado, utilizando as enzimas de reparo ENDO III e FPG. O ensaio cometa é uma técnica bioquímica simples que detecta quebras no DNA e corresponde a um ensaio citogenético. Este ensaio é aplicável em qualquer suspensão de células eucarióticas,

independentemente de estarem em proliferação ou não (HARTMANN *et al.*, 2001; COLLINS, 2004), sendo possível a detecção de danos primários no DNA, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (DUSINSKA *et al.*, 1998; LEE e STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2006). Neste trabalho, a formulação de Mel-LNC reduziu significativamente o dano oxidativo de DNA causado pelo paraquat, e isso não foi observado quando as células foram tratadas com melatonina livre. O dano de DNA pode ser causado por diferentes mecanismos, sendo que um deles é devido ao aumento na produção de espécies reativas, que agem danificando o DNA celular, que é o principal mecanismo de toxicidade do paraquat. A melatonina, por se tratar de um potente antioxidante agindo principalmente no sequestro de espécies reativas, mostrou-se eficaz em prevenir o dano de DNA oxidativo *in vitro* em linfócitos (SLIWINSKI *et al.*, 2007). Recentemente, estudo conduzido com ratos expostos ao chumbo foi verificado que o tratamento com melatonina foi capaz de reduzir as ERs produzidas por esse metal e também reduzir o dano ao DNA, porém esse dano não foi reparado quando doses mais elevadas de chumbo foram administradas, indicando que o nível de dano induzido pelo agente tóxico depende da dose desse agente e da concentração da substância antioxidante (MARTINEZ-ALFARO *et al.*, 2012).

Com relação aos estudos realizados com *C. elegans* foi possível observar que o paraquat 0,5 mM reduziu significativamente a sobrevivência dos nematoides, havendo uma porcentagem de morte de 30%. Além disso, foi verificado que nos nematoides tratados com essa mesma concentração de paraquat houve uma redução significativa do seu tamanho, indicando uma anormalidade no desenvolvimento dos mesmos e também um aumento significativo na produção de espécies reativas. Com o pré-tratamento com LNC, Mel-LNC e Mel foi possível verificar que somente a Mel-LNC foi capaz de aumentar a sobrevivência dos nematoides, manter o seu desenvolvimento normal, além de reduzir significativamente a produção de espécies reativas.

Göcgeldi e colaboradores (2008) relataram o uso da melatonina associada à dexametasona nos casos de intoxicação pelo paraquat, havendo um aumento na sobrevivência de ratos intoxicados pelo paraquat (GÖCGELDI *et al.*, 2008). Porém, devido a sua baixa biodisponibilidade, doses altas e repetidas eram necessárias para obter esse resultado, além da associação

com outra substância. Nesse trabalho foi verificado que com uma única dose e em baixa concentração no modelo *C. elegans*, somente a melatonina incorporada a nanocápsulas foi capaz de aumentar a sobrevivência dos nematoides quando comparada com a melatonina livre. Esses dados sugerem que com o uso da nanotecnologia, doses menores da substância ativa são eficazes, melhorando as suas propriedades biológicas.

Outro parâmetro de toxicidade avaliado foi o desenvolvimento do *C. elegans* após atingir a fase adulta. Por se tratar de um agente extremamente tóxico que causa severo estresse, o paraquat reduziu significativamente o tamanho dos nematoides, sendo que o pré-tratamento com Mel-LNC protegeu os nematoides, tendo um desenvolvimento normal mesmo após a exposição ao paraquat. Porém isso não foi observado quando os nematoides foram tratados com melatonina livre. Recentemente, um estudo desenvolvido por Tepper e colaboradores (2014), relatou a descoberta do fator de transcrição PQM-1 que regula genes de classe II no *C. elegans*, responsáveis pelo desenvolvimento normal desse nematoide e está relacionado com o fator de transcrição DAF-16. Em condições normais, PQM-1 está localizado no núcleo, promovendo o crescimento e desenvolvimento normais dos nematoides. Sob condições de estresse, o PQM-1 deixa o núcleo para a entrada do fator DAF-16 (homólogo ao fator FOXO em humanos), que ativa os genes de classe I responsáveis pela resposta ao estresse. A resposta ao estresse é necessária para a sobrevivência dos nematoides frente ao ataque de agentes estressores, porém ele fica mais susceptível a inibição do seu desenvolvimento (TEPPER, MURPHY e BUSSEMAKER, 2014).

Neste contexto, o paraquat aumentou significativamente a produção de espécies reativas no *C. elegans*, corroborando com estudos *in vivo* e *in vitro* que indicam o aumento de espécies reativas e, conseqüentemente, o aumento do estresse oxidativo como o principal mecanismo de toxicidade do paraquat (MELCHIORRI *et al.*, 1996; SUNTRES *et al.*, 2002; YEH *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2012; ZERIN *et al.*, 2012; TOYGAR *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado nesse trabalho que o pré-tratamento com Mel-LNC foi capaz de diminuir as espécies reativas produzidas pelo paraquat, fato esse não observado quando os nematoides foram pré-tratados com melatonina livre. Isso pode ter sido observado pelo fato de a incorporação da melatonina a nanocápsulas de

núcleo lipídico ser capaz de aumentar a propriedade antioxidante dessa substância, como relatado acima (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2008). Estudos prévios mostraram que repetidas doses de melatonina foram capazes de proteger pulmão e fígado de ratos expostos ao paraquat contra o estresse oxidativo (MELCHIORRI *et al.*, 1995), além de aumentar os níveis de glutathione reduzida no pulmão e fígado, mostrando atuar sobre o sistema antioxidante do organismo (MELCHIORRI *et al.*, 1996). A literatura relata que a melatonina é capaz de atuar ativando o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que é uma proteína chave no controle do status redox da célula durante o estresse oxidativo. Dessa maneira, Nrf2 é essencial para efetiva detoxificação de ERs e pode proteger contra citotoxicidade resultante da regulação da peroxidação lipídica, depleção de GSH e disfunção mitocondrial (DING *et al.*, 2014).

Apesar dos promissores usos relacionados com a nanotecnologia, é importante ressaltar a necessidade da avaliação da segurança desses novos nanomateriais. Estudos toxicológicos são vitais para garantir a segurança de substâncias. Para tal, estudos *in vitro* e *in vivo* são propostos para tentar avaliar e elucidar a toxicidade de substâncias nanoencapsuladas. Com relação aos estudos *in vivo* para avaliar efeitos adversos de substâncias, geralmente é utilizado um grande número de roedores, e são extremamente caros e demorados. Isto tem como resultado um acúmulo de substâncias que necessitam ser testadas. Com isso, muitas agências governamentais têm colaborado para delinear a necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos, confiáveis e alternativos (LILIENBLUM *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* são os mais utilizados quando se trata de estudos de nanotoxicologia, porém há relatos que existe uma fraca correlação entre os estudos *in vitro/in vivo* (FISCHER e CHAN, 2007; SAYES, REED e WARHEIT, 2007).

Desse modo, nos últimos anos, um modelo alternativo e bem caracterizado tem sido de grande relevância para avaliar substâncias benéficas e tóxicas ao organismo bem como para identificar novos alvos para intervenções farmacológicas, o nematóide *Caenorhabditis elegans* (KALETTA e HENGARTNER, 2006; BOYD, MCBRIDE e FREEDMAN, 2007). Isso é possível por haver uma forte correlação entre o *C. elegans* e os mamíferos em princípios celulares e moleculares, sendo que 60 a 80% dos genes humanos

possuem homólogos no *C. elegans* (BRENNER, 1974; BOYD, MCBRIDE e FREEDMAN, 2007).

Dessa maneira, nesse estudo também foi avaliada a toxicidade das nanocápsulas de núcleo lipídico, utilizando PCL como polímero, sem melatonina associada (LNC). Para tal, os nematoides foram expostos a seis concentrações crescentes de LNC. De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que as LNC apresentaram baixa toxicidade, mostrando segurança para o seu uso nesse modelo. De acordo com os experimentos realizados, foi observado um alto valor para a dose letal (DL₅₀) sendo esta muito próxima à última concentração máxima utilizada neste experimento, além disso, o valor de DL₅₀ encontrado é dez vezes maior que as usadas em estudos prévios com ratos *wistar* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (BULCAO et al., 2013). Além disso, foi possível observar que somente na última dose testada ocorreu uma redução significativa do tamanho dos nematoides, doses essas bem mais elevadas do que as normalmente usadas nos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* descritos na literatura (SCHAFFAZICK et al., 2005; BERNARDI et al., 2008; BULCAO et al., 2013; BULCAO et al., 2014) e a dose utilizada nesse trabalho. Uma vez que o aumento de espécies reativas é considerado um efeito adverso, a avaliação desse parâmetro também é importante para a avaliação toxicológica (MANKE, WANG e ROJANASAKUL, 2013). Nesta linha, observou-se um aumento das espécies reativas dose-dependente, com um aumento significativo a partir do grupo IV ($23,70 \times 10^{12}$ partículas/ml), indicando novamente que esse efeito adverso só foi verificado em doses elevadas. Todos esses dados em conjunto corroboram com estudo realizado em ratos com as mesmas nanocápsulas, onde foi verificado que após a injeção intraperitoneal, a PCL não causou morte nem efeitos adversos em ratos (BULCAO et al., 2013). Dessa maneira sugere-se que a utilização do *C. elegans* em nanotoxicologia é de grande valia, sendo que sua utilização leva a uma redução no uso de roedores resultando em dados prévios para um estudo sequencial em animais.

Com relação ao efeito pronunciado da Mel-LNC, tanto nos estudos *in vitro* como *in vivo*, isso pode ser explicado devido ao mecanismo de distribuição da melatonina quando associada às nanocápsulas e também as propriedades antioxidantes das próprias LNC *per se*. Recentemente, foi

demonstrado que a Mel-LNC possui mecanismo de distribuição do tipo II onde cerca de 40% da melatonina está incorporada às nanocápsulas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Isso faz com que cerca de 1200 moléculas de melatonina possam ser carregadas por uma nanocápsula, conferindo à formulação uma grande dose de chegada. Além disso, em estudo *in vitro* utilizando lipossomas, de Bender e colaboradores (2014), verificou-se que a LNC possui efeitos antioxidantes *per se*, onde foi observada uma diminuição na formação de radical ascorbil, e consequente redução na peroxidação lipídica. Apesar desse efeito não ter sido observado em nosso estudo *in vivo*, acredita-se que esse efeito pode contribuir para a melhora na atividade antioxidante da melatonina, mesmo não apresentando efeito antioxidante frente à exposição ao paraquat no modelo *C. elegans* quando utilizado somente LNC (BENDER *et al.*, 2014).

Assim, de acordo com os resultados obtidos tanto nos ensaios *in vitro* como nos experimentos *in vivo*, é possível afirmar que a Mel-LNC se mostrou eficaz para reduzir os danos causados pelo herbicida paraquat. Dessa maneira, uma vez que já está bem descrito na literatura que o principal mecanismo de toxicidade do paraquat é o estresse oxidativo, o uso da formulação de Mel-LNC, cujas propriedades antioxidantes melhoraram quando aliadas ao uso da nanotecnologia, pode ser um bom candidato para estudos futuros nos casos de intoxicação por paraquat. Além disso, verificou-se que as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são seguras para o uso no modelo *C. elegans* e esse modelo é extremamente útil para a realização de screening toxicológico.

CONCLUSÕES

- ❖ De acordo com os resultados dos testes *in vitro*, o PQ reduziu significativamente a viabilidade celular na linhagem A549 de uma maneira dose e tempo-dependente;
- ❖ As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), melatonina associada à nanocápsulas (Mel-LNC) e melatonina livre (Mel) não apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos na linhagem A549 nas concentrações utilizadas no estudo;
- ❖ A formulação Mel-LNC foi capaz de aumentar a viabilidade celular em relação às células tratadas com PQ. Isso não foi observado quando as células foram tratadas com melatonina livre;
- ❖ A formulação Mel-LNC protegeu as células A549 do dano de DNA causado pelo PQ quando comparado com o tratamento com melatonina livre e grupo sem tratamento.
- ❖ A principal via de captação da Mel-LNC no *C. elegans* é a via oral e após três horas de tratamento ocorre a distribuição da formulação para o restante dos tecidos do nematoide;
- ❖ O herbicida paraquat mostrou relevante toxicidade no *C. elegans*, com alta mortalidade, aumento do estresse oxidativo e alterações no desenvolvimento do nematoide;
- ❖ A formulação Mel-LNC foi capaz de proteger os nematoides dos danos causados pelo PQ, fato esse não observado quando tratados com melatonina livre ou LNC. Houve um aumento na sobrevivência, diminuição das ERs produzidas pelo PQ, além de desenvolvimento normal dos nematoides;
- ❖ Foi possível verificar que as LNC podem ser consideradas seguras para o uso no modelo *in vivo* alternativo *C. elegans*, uma vez que apresentou alto valor para DL₅₀, e alterações no desenvolvimento e produção de ERs somente ocorreram em doses cinco vezes mais elevadas que as utilizadas em experimentos para testes terapêuticos;
- ❖ O modelo alternativo *C. elegans* mostrou-se útil para os testes de nanotoxicologia, bem como estudos de novas formulações com potencial uso na terapêutica;

PERSPECTIVAS

Estudos com *C. elegans*

- ❖ Avaliar se a formulação Mel-LNC age sobre enzimas como a SOD e CAT. Para tal será utilizado cepas com genes repórteres para avaliar a expressão das enzimas antioxidantes SOD e CAT, que estão envolvidas no processo de detoxificação do organismo;
- ❖ Avaliar o mecanismo de ação da formulação M-LNC através da cepa DAF-16:GFP, a qual expressa a ativação ou não do fator de transcrição DAF-16, um gene homólogo ao FOXO (seres humanos), responsável vários processos biológicos, dentre eles, resposta ao estresse oxidativo, através da ativação de enzimas antioxidantes;
- ❖ Quantificar o dano lipídico através da quantificação de malondialdeído em homogenato de *C. elegans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, J. M. et al. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 108, p. 343-52, 2014.
- ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **Int J Pharm**, v. 341, n. 1-2, p. 215-20, 2007.
- ANDRADE FILHO, A.; CHARNIZON, D.; AMARAL, M.S.G. Intoxicação por paraquat. In: ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. (Ed.). **Toxicologia na prática clínica**. Folium editorial, Belo Horizonte, 2013. cap. 47, p. 533-42.
- ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 2, p. 151-65, 2012.
- AVILA, D. S. et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1903-10, 2012.
- BENDER, E.A. et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules. **Pharm Res**, v. 31, p. 2975-87, 2014.
- BENES, L. et al. Transmucosal, oral controlled-release, and transdermal drug administration in human subjects: a crossover study with melatonin. **J Pharm Sci**, v. 86, n. 10, p. 1115-9, 1997.
- BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Lett**, v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.
- BERNARDI, A. et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. **Eur J Pharmacol**, v. 586, n. 1-3, p. 24-34, 2008.
- BERNARDI, A. et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by Abeta1-42 in Alzheimer's disease models. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 4927-42, 2012.
- BISMUTH, C. et al. Elimination of paraquat. **Hum Toxicol**, v. 6, n. 1, p. 63-7, 1987.
- BLANCO-AYALA, T.; ANDERICA-ROMERO, A. C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radic Res**, v. 48, n. 6, p. 623-40, 2014.
- BOYD, W. A.; MCBRIDE, S. J.; FREEDMAN, J. H. Effects of genetic mutations and chemical exposures on *Caenorhabditis elegans* feeding: evaluation of a

novel, high-throughput screening assay. **PLoS One**, v. 2, n. 12, p. e1259, 2007.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 5, p. 631-51, 2002.

BRZEZINSKI, A. et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. **Sleep Med Rev**, v. 9, n. 1, p. 41-50, 2005.

BULCAO, R. P. et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 86, n. 2, p. 167-77, 2014.

BULCAO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicol Sci**, v. 132, n. 1, p. 162-76, 2013.

BUS, J. S.; AUST, S. D.; GIBSON, J. E. Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 11, n. 1, p. 31-8, 1975.

CAI, S. et al. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. **J Control Release**, v. 146, n. 2, p. 212-8, 2010.

CASEY, A. et al. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1425-1432, 2007.

CATTANI, V. B. et al. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **Eur J Pharm Sci**, v. 39, n. 1-3, p. 116-24, 2010.

CIT. Dados e indicadores selecionados 2007. **Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul**, 2007. Disponível em: <<http://www.cit.rs.gov.br/>>.

CLIFT, M. J.; GEHR, P.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 7, p. 723-31, 2011.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-61, 2004.

CORADINI, K. et al. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. **Eur J Pharm Biopharm**, 2014.

COS, S. et al. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 58, n. 19, p. 4383-90, 1998.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **Int J Pharm**, v. 313, n. 1-2, p. 198-205, 2006.

DAMGE, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **J Control Release**, v. 117, n. 2, p. 163-70, 2007.

DE ARAUJO, T. M. et al. Insulin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles: efficient, sustained and safe insulin delivery system. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, n. 6, p. 1098-106, 2013.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 2, p. 589-605, 2010.

DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. **J Biomed Nanotechnol**, v. 10, n. 6, p. 1137-45, 2014.

DING, K. et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism. **Free Radic Biol Med**, v. 73C, p. 1-11, 2014.

DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. **Occup Environ Med**, v. 61, n. 9, p. 727-8, 2004.

DUSINSKA, M. et al. Responses of alveolar macrophages and epithelial type II cells to oxidative DNA damage caused by paraquat. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 5, p. 809-12, 1998.

ELLEGAARD-JENSEN, L.; JENSEN, K. A.; JOHANSEN, A. Nano-silver induces dose-response effects on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 80, p. 216-23, 2012.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 8, p. 2950-62, 2009.

FARIA, H. C. I. T. **Estudo Comparativo de Citotoxicidade e Internalização de Nanopartículas de Ouro com Diferentes Revestimentos**. 2010. (Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica, Clínica e Forense). Universidade do Porto, Porto.

FERIN, J.; OBERDORSTER, G.; PENNEY, D. P. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 6, n. 5, p. 535-42, 1992.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-71, 2005.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 6, p. 565-71, 2007.

FROZZA, R. L. et al. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, n. 12, p. 2086-104, 2013.

FROZZA, R. L. et al. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **J Biomed Nanotechnol**, v. 6, n. 6, p. 694-703, 2010.

GAMI, M. S.; WOLKOW, C. A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 31-7, 2006.

GARCIA, M. B. F. Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas. **Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis**, p. 154, 2010.

GARCIA, S. C. et al. Polymeric Nanoparticles: In Vivo Toxicological Evaluation, Cardiotoxicity, and Hepatotoxicity. In: DURÁN, N.; GUTERRES, S. S., et al (Ed.). **Nanotoxicology. Materials, Methodologies and Assessments**. New York: Springer, 2014. cap. 14, p.299-324.

GARNIER, R. et al. Paraquat poisoning by skin absorption: report of two cases. **Vet Hum Toxicol**, v. 36, n. 4, p. 313-5, 1994.

GE, W.; WANG, H. L.; SUN, R. P. Clinical characteristics of paraquat poisoning in 22 chinese children. **Indian J Pediatr**, v. 81, n. 7, p. 670-4, 2014.

GOCGELDI, E. et al. Establishing the use of melatonin as an adjuvant therapeutic against paraquat-induced lung toxicity in rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, n. 9, p. 1133-41, 2008.

GUO, L. et al. Adsorption of essential micronutrients by carbon nanotubes and the implications for nanotoxicity testing. **Small**, v. 4, n. 6, p. 721-7, 2008.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e Aplicações de Nanopartículas para a Liberação Controlada de Fármacos. In: MORALES, M. (Ed.). **Terapias Avançadas: Células Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia**: Atheneu, 2007.

HAAS, S. E. et al. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 2, p. 156-61, 2009.

HARTMANN, A. et al. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. **Mutat Res**, v. 497, n. 1-2, p. 199-212, 2001.

HE, X. et al. Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 342, n. 1, p. 81-90, 2012.

HOFFMANN, H. et al. Evaluation of an oral pulsatile delivery system for melatonin in humans. **Pharmazie**, v. 53, n. 7, p. 462-6, 1998.

HUANG, Y. W.; WU, C.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. **Materials**, v. 3, p. 4842-4859, 2010.

JAIN, A. K. et al. The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 503-15, 2011.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-98, 2006.

KANG, C. et al. Absolute lymphocyte count as a predictor of mortality in emergency department patients with paraquat poisoning. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78160, 2013.

KARBOWNIK, M.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen delta-aminolevulinic acid. **Int J Cancer**, v. 88, n. 1, p. 7-11, 2000.

KAY, L.; SHAPIRA, P. Developing nanotechnology in Latin America. **J Nanopart Res**, v. 11, n. 2, p. 259-278, 2009.

KIM, J. H. et al. Effect of glutathione administration on serum levels of reactive oxygen metabolites in patients with paraquat intoxication: a pilot study. **Korean J Intern Med**, v. 25, n. 3, p. 282-7, 2010.

KIM, S. W.; NAM, S. H.; AN, Y. J. Interaction of silver nanoparticles with biological surfaces of *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 77, p. 64-70, 2012.

KROLL, A. et al. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. **Arch Toxicol**, v. 86, n. 7, p. 1123-36, 2012.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LERNER, A. B. et al. Melatonin in peripheral nerve. **Nature**, v. 183, p. 1821, 1959.

LI, Y. et al. Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Hazard Mater**, v. 219-220, p. 221-30, 2012.

LILIENBLUM, W. et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). **Arch Toxicol**, v. 82, n. 4, p. 211-36, 2008.

LIU, W. T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 1-7, 2006.

LIU, Q. et al. Enhanced antitumor efficacy, biodistribution and penetration of docetaxel-loaded biodegradable nanoparticles. *Int J Pharm*, v. 430, p. 350-8, 2012

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **J Nanobiotechnology**, v. 9, p. 55, 2011.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 942916, 2013.

MARQUIS, B. J. et al. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**, v. 134, n. 3, p. 425-39, 2009.

MARTINEZ-ALFARO, M. et al. Effect of melatonin administration on DNA damage and repair responses in lymphocytes of rats subchronically exposed to lead. **Mutat Res**, v. 742, n. 1-2, p. 37-42, 2012.

MAYNARD, A. D.; WARHEIT, D. B.; PHILBERT, M. A. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. **Toxicol Sci**, v. 120 Suppl 1, p. S109-29, 2011.

MELCHIORRI, D. et al. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. **Life Sci**, v. 56, n. 2, p. 83-9, 1995.

MELCHIORRI, D. et al. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. **Biochem Pharmacol**, v. 51, n. 8, p. 1095-9, 1996.

MITSOPOULOS, P.; SUNTRES, Z. E. Cytotoxicity and gene array analysis of alveolar epithelial A549 cells exposed to paraquat. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 3, p. 427-36, 2010.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; TRAN, C. L. Nanotoxicology – Characterization, Dosing and Health Effects. In: HEALTHCARE, I. (Ed.). **Edited by Nancy A. Monteiro – Riviere and C.Lang Tran**. New York, 2007.

MORAN, J. M. et al. Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 24, n. 6, p. 402-9, 2010.

NEGI, G.; KUMAR, A.; SHARMA, S. S. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 124-31, 2011.

OBERDORSTER, G.; FERIN, J.; MORROW, P. E. Volumetric loading of alveolar macrophages (AM): a possible basis for diminished AM-mediated particle clearance. **Exp Lung Res**, v. 18, n. 1, p. 87-104, 1992.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 7, p. 823-39, 2005.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 6, p. A290, 2007.

OLIVEIRA C.G.; et al. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations, **Soft Matter**, v. 9, p. 1141-50, 2013.

PATEL, T. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 7, p. 701-5, 2012.

PRAMANIK, D. et al. A composite polymer nanoparticle overcomes multidrug resistance and ameliorates doxorubicin-associated cardiomyopathy. **Oncotarget**, v. 3, n. 6, p. 640-50, 2012.

QIU, L. et al. Phagocytic uptake and ROS-mediated cytotoxicity in human hepatic cell line of amphiphilic polyphosphazene nanoparticles. **J Biomed Mater Res A**, v. 101, n. 1, p. 285-97, 2013.

RANCAN, F.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v. 7, p. 23-34, 2014.

RANJBAR, A. Evidence of Oxidative Damage in Paraquat Toxicity **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 16, n. 12, p. 1-7, 2014.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr Rev**, v. 12, n. 2, p. 151-80, 1991.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. **J Biomed Sci**, v. 7, n. 6, p. 444-58, 2000.

REITER, R. J. et al. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. **Biol Signals Recept**, v. 9, n. 3-4, p. 160-71, 2000.

ROH, J. Y.; LEE, J.; CHOI, J. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. **Environ Toxicol Chem**, v. 25, n. 11, p. 2946-56, 2006.

RUSSEL, W.; BURCH, R. **The principles of human experimental technique**. London: Methuen & Co. Ltd. London, 1959.

SABZGHABAEI, A. M. et al. Fatality in paraquat poisoning. **Singapore Med J**, v. 51, n. 6, p. 496-500, 2010.

SAYES, C. M.; REED, K. L.; WARHEIT, D. B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 1, p. 163-80, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 56, n. 3, p. 501-5, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **Int J Pharm**, v. 289, n. 1-2, p. 209-13, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. **Pharmazie**, v. 62, n. 5, p. 354-60, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 69, n. 1, p. 64-71, 2008.

SCHIERENBERG, E.; WOOD, W. B. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol**, v. 107, n. 2, p. 337-54, 1985.

SCHMITT, G. C. et al. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 235-243, 2006.

SHAH, L. K.; AMIJI, M. M. Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. **Pharm Res**, v. 23, n. 11, p. 2638-45, 2006.

SHEN, L. et al. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 28, n. 1, p. 125-32, 2009.

SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **Int J Pharm**, v. 293, n. 1-2, p. 261-70, 2005.

SINGHAL, N. K. et al. Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 97-109, 2011.

SLIWINSKI, T. et al. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. **Mutat Res**, v. 634, n. 1-2, p. 220-7, 2007.

SUN, Y. et al. The protective effect of C-phycoerythrin on paraquat-induced acute lung injury in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 32, n. 2, p. 168-74, 2011.

SUNTRES, Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 65-77, 2002.

SYNGENTA. Centro de Informações sobre o Paraquat. 2013. Disponível em: < <http://paraquat.com/portugues> >. Acesso em: 20 de maio de 2014.

TAN, D. X. et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J Pineal Res**, v. 42, n. 1, p. 28-42, 2007.

TAN, D. X. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr Top Med Chem**, v. 2, n. 2, p. 181-97, 2002.

TEPPER, R. G.; MURPHY, C. T.; BUSSEMAKER, H. J. DAF-16 and PQM-1: partners in longevity. **Aging (Albany NY)**, v. 6, n. 1, p. 5-6, 2014.

TOYGAR, M. et al. The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity. **Hum Exp Toxicol**, 2014.

TSYUSKO, O. V. et al. Toxicogenomic responses of the model organism *Caenorhabditis elegans* to gold nanoparticles. **Environ Sci Technol**, v. 46, n. 7, p. 4115-24, 2012.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1-3, p. 200-208, 2011.

VIELMA, J. R. et al. Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: A review. **Acta Trop**, v. 137C, p. 31-38, 2014.

VIJAYALAXMI et al. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 10, p. 2575-601, 2002.

VILLELA, I. V. et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat Res**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, 2006.

WANG, H.; WICK, R. L.; XING, B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environ Pollut**, v. 157, n. 4, p. 1171-7, 2009.

WHO. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2004. Geneva, p. 21-25, 2005. Disponível em: < http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf >.

WUNNAPUK, K. et al. Prediction of paraquat exposure and toxicity in clinically ill poisoned patients: a model based approach. **Br J Clin Pharmacol**, 2014.

YANG, X. et al. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environ Sci Technol**, v. 46, n. 2, p. 1119-27, 2012.

YANG, X. et al. Silver nanoparticle behavior, uptake, and toxicity in *Caenorhabditis elegans*: effects of natural organic matter. **Environ Sci Technol**, v. 48, n. 6, p. 3486-95, 2014.

YEH, S. T. et al. Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells. **Toxicology**, v. 223, n. 3, p. 181-90, 2006.

YIN, H. et al. Resveratrol-Loaded Nanoparticles Reduce Oxidative Stress Induced by Radiation or Amyloid- in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1536-1544, 2014.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **Eur J Pharm Biopharm**, 2012.

ZERIN, T. et al. Protective effect of methylprednisolone on paraquat-induced A549 cell cytotoxicity via induction of efflux transporter, P-glycoprotein expression. **Toxicol Lett**, v. 208, n. 2, p. 101-7, 2012.

ZHOU, Q. et al. Paraquat poisoning by skin absorption: Two case reports and a literature review. **Exp Ther Med**, v. 6, n. 6, p. 1504-1506, 2013.