

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

Estudo *in vivo* da toxicidade pulmonar e sistêmica após doses repetidas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas

GUILHERME BORGES BUBOLS

PORTO ALEGRE, 2021

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

Estudo *in vivo* da toxicidade pulmonar e sistêmica após doses repetidas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Tese de doutorado apresentada por **Guilherme Borges Bubols** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Solange Cristina Garcia

Porto Alegre, 2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13.09.2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Luiza Abrahão Frank
Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter)

Profa. Dr. Natália Brucker
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo (Banca suplente)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Bubols, Guilherme Borges
Estudo in vivo da toxicidade pulmonar e sistêmica após doses repetidas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas / Guilherme Borges Bubols. -- 2021. 145 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, 2021.

1. Nanotoxicologia. 2. Nanotubos de carbono. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Título.

Agradecimentos ao CNPq pelo período de financiamento da bolsa de estudos para o presente trabalho, à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos Laboratórios de Toxicologia (LATOX) e 405 de Nanotecnologia, da Faculdade de Farmácia desta Universidade, ao Laboratório de Materiais Cerâmicos (LACER) desta Universidade, ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTEC), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), por todo o apoio necessário para a realização dos experimentos contidos neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Solange agradeço pela confiança, pelos aprendizados e a oportunidade de compor o grupo de pesquisa, onde pude compreender a importância da pesquisa científica, e também pela orientação desta tese.

Agradeço muito à minha família: especialmente à minha mãe, a quem dedico as minhas conquistas na vida – grande parte delas carrega teus esforços e apoio incondicional –, pois cada degrau que pude alcançar só foi possível pelo teu incentivo, amparo, amor, compreensão e exemplo.

Aos colegas de LATOX, sou extremamente grato pela ajuda que pude receber neste trabalho, pelo companheirismo e tanto pelas valiosas contribuições, trocas de experiência e discussões científicas, quanto pelas risadas e momentos de descontração; sei que fiz grandes amizades e parcerias neste grupo, sem falar daquelas mais ainda fortalecidas ao longo desses anos.

A todos os bons, velhos, inerentes amigos por dividirmos tantas histórias, compartilharmos encontros, viagens, durante todos esses anos de amizade.

Aos professores Ruy Beck, Natália Brucker e Luiza Frank por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura para realizar este curso.

Ao CNPq pelo fomento através do período de concessão da bolsa e do financiamento do projeto de pesquisa.

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 de doutorado foi redigida na forma de encarte para publicações e está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos; Parte II: Manuscrito; Parte III: Manuscrito II; Parte IV: Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** apresenta o estado da arte do tema que sustenta esta proposta de trabalho. Nos **Objetivos** constam os principais questionamentos que motivam a realização do trabalho.

Os **Materiais e Métodos**, **Resultados** e as **Referências** específicas encontram-se no corpo do manuscrito.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos e que estão descritos no manuscrito.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais dos principais resultados apresentados. Em seguida, encontra-se a seção **Perspectivas**, onde se apontam os próximos caminhos com o trabalho desta tese.

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

RESUMO

Os nanotubos de carbono (NTC) são materiais promissores para aplicações industriais, dentre os quais os NTC de paredes múltiplas (NTCPM) representam uma parcela expressiva desses nanomateriais manufaturados. Alguns NTC apresentam-se morfologicamente finos e retos semelhantes a agulhas, portanto trazendo uma semelhança estrutural às fibras de asbesto. Informações prévias disponíveis em estudos *in vitro* e *in vivo* sobre NTC indicam principalmente ocorrência de inflamação pulmonar, notando-se ainda relatos sobre fibrose pulmonar e grande interesse em investigar o desenvolvimento de câncer e os mecanismos envolvidos. Neste contexto, há necessidade de se obter dados toxicológicos mais aprofundados e em maior número de compostos. Para se avaliar a segurança de nanomateriais, estudos nanotoxicológicos avaliando modelos *in vivo* e utilizando via de exposição pelo trato respiratório apresentam grande relevância, especialmente no que tange às exposições ocupacionais e ambientais. Neste trabalho, conduziu-se uma investigação nanotoxicológica de dois diferentes NTCPM após caracterização físico-química, administrados por via intratraqueal em modelo animal. Realizaram-se quatro instilações intratraqueais consecutivas em ratas Sprague Dawley nos dias 1, 9, 17 e 25 dos nanomateriais NM-401 e NM-403 em dispersão em concentrações baixas e altas (60 µg e 180 µg), asbesto crocidolite (180 µg) como material de referência e controle veículo polissorbato 80 a 0,1% (n = 8 por grupo), sendo avaliados nos tempos de 3, 7, 30 e 90 dias após a última instilação. Os resultados da caracterização do NM-401 e NM-403 mostraram que o primeiro composto se apresenta no formato de agulhas, longo e espesso, ao passo que o segundo possui morfologia emaranhada e curva, curto e fino. Os NTCPM testados neste estudo foram estáveis em dispersão, apesar de haver um grau de aglomeração. Os resultados nanotoxicológicos indicaram que os nanocompostos foram capazes de induzir alterações sistêmicas e pulmonares. Os achados demonstram alterações transitórias em marcadores bioquímicos de função renal e no biomarcador de estresse oxidativo de dano lipídico, nos tempos pós-exposição mais recentes. Em

paralelo, a análise das curvas de crescimento animal mostrou sinais de toxicidade geral em tempos após as exposições, além de um aumento na liberação de LDH pulmonar no dia 3 após as administrações. Adicionalmente, algumas alterações foram observadas em tempos posteriores após as instilações, como redução nos pesos relativos hepáticos e renais, detectados como alterações tardias nos animais expostos às doses mais altas dos NTCPM, em conjunto com alterações histológicas pontuais nos tecidos hepáticos e renais; além disso, o dano pulmonar foi observado como granuloma, espessamento de septo alveolar, focos hemorrágicos e fibrose. A avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa e do teste de micronúcleos nos animais expostos indicou ausência de danos ao DNA após 3 dias da última instilação; detectou-se baixa frequência de micronúcleos na medula óssea nos animais instilados com NM-401, porém a análise de eritrócitos policromáticos/normocromáticos não indicou toxicidade medular nos grupos de estudo. Os resultados apresentados contribuem para elucidar os aspectos toxicológicos envolvidos após exposições pulmonares repetidas a ambos os NTCPM testados, tanto nos pulmões como em tecidos extrapulmonares. Deve-se, ainda, aprofundar os mecanismos envolvidos em próximos estudos, bem como avaliar diferentes nanotubos de carbono para aumentar o conhecimento disponível sobre a toxicidade desses nanocompostos específicos de interesse industrial.

Palavras-chave: Nanotoxicologia; Sprague Dawley, intratraqueal, pulmão; NM-401; NM-403; NTCPM.

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNT) are promising materials for industrial applications and multi-walled CNT (MWCNT) represent an expressive amount of these manufactured nanomaterials. Some CNT present needle-like morphology, thus structurally resembling asbestos fibers. Previously available *in vitro* and *in vivo* data on CNT mostly indicate lung inflammation, and some reports on pulmonary fibrosis were noted in addition to the interest in assessing the development of cancer and the involved mechanisms. In this context, there is need to obtain detailed toxicological information and study more compounds. To ensure safety of nanomaterials, nanotoxicity studies targeting exposures to the respiratory tract present great relevance, especially considering exposures in occupational settings and the environment. In this work, we performed a nanotoxicological investigation of two different, well-characterized MWCNT in rats after intratracheal exposures. Female Sprague-Dawley rats were submitted to four consecutive instillations at day 1, day 9, day 17 and day 25 with NM-401 and NM-403 dispersions at low and high doses (60 µg and 180 µg), asbestos crocidolite (180 µg) as reference material and vehicle polysorbate 80 0.1% controls (n=8/group) and follow-up times were 3, 7, 30 and 90 days after the last instillation. Characterization data on NM-401 and NM-403 indicated that the first was found as needle-like, long, thick, while the latter was entangled, short and thin. MWCNT in this study were found stable in dispersion, despite the agglomeration. Toxicological data indicated that the nanocompounds were able to induce some systemic and pulmonary alterations. The present findings demonstrate transient alterations in biochemical markers of renal function and oxidative stress biomarkers of lipid damage in recent post-exposure time points. In parallel, analysis of animal growth curves shows signs of general toxicity in the immediate times after exposures, in addition to increased pulmonary LDH release at day 3 after instillations. Additionally, few alterations were observed in further time points after instillations, such as the liver and kidney weight decreases, detected as late alterations in the exposed animals at higher MWCNT doses, together with single histological alterations in hepatic and renal

tissues; besides, pulmonary damage was observed as granuloma, alveolar septa thickening, hemorrhagic foci and fibrosis. The genotoxicity evaluation by the comet assay and the micronucleus test indicated in the exposed animals absence of DNA damage 3 days after the last instillation; a low micronuclei frequency in bone marrow was found in animals instilled with NM-401; however, analysis of the ratio of polychromatic erythrocytes to normochromatic erythrocytes did not indicate medular toxicity in the study groups. Our results contribute to elucidate the toxicological aspects involved after pulmonary repeated exposures to both manufactured MWCNT, both in lungs and extrapulmonary tissues. The involved mechanisms should still be evaluated in further studies as well as different types of carbon nanotubes to improve the knowledge on hazard assessment of these specific nanocompounds of industrial interest.

Keywords: Nanotoxicology; Sprague Dawley; intratracheal; lung; NM-401; NM-403; MWCNT.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação das estruturas constituídas por carbono. (a) estrutura de um nanotubo de carbono de parede simples; (b) estrutura bidimensional do grafeno; (c) fulereno C₆₀.

Figura 2. Principais mecanismos possivelmente associados à toxicidade dos nanotubos de carbono.

MANUSCRITO I

Figura 1. Esquema representativo do protocolo experimental.

Figura 2. Caracterização morfológica dos nanotubos de carbono NM-401 e NM-403 por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 3. Caracterização físico-química por espectroscopia Raman de NM-401 e NM-403 na faixa de frequência entre 100–3200 cm⁻¹.

Figura 4. Caracterização da distribuição do diâmetro dos nanotubos de carbono NM-401 e NM-403 por espalhamento de luz dinâmico em 10 medidas repetidas.

Figura 5. Caracterização da estabilidade dos nanotubos de carbono NM-401 e NM-403 por espalhamento de luz dinâmico após 0, 60, 120 e 180 minutos.

Figura 6. Ganho de peso relativo dos animais expostos a NM-401 e NM-403 por instilações intratraqueais consecutivas após diferentes tempos pós-exposição: (A) 3 dias, (B) 7 dias, (C) 30 dias e (D) 90 dias. PS80: grupo polissorbato 80 (0,1%), ASB: grupo asbesto, LD401 (dose baixa NM-401) e HD401 (dose alta NM-401), LD403 (dose baixa NM-403) e HD403 (dose alta NM-403).

Figura 7. Peso relativo de (A) pulmões, (B) fígado, (C) rim direito, (D) rim esquerdo, (E) baço, e (F) coração nos tempos de exposição 3, 7, 30 e 90 dias após instilações repetidas de NM-401 e NM-403. PS80: grupo polissorbato 80 (0,1%), ASB: grupo asbesto, LD401 (dose baixa NM-401) e HD401 (dose alta NM-401), LD403 (dose baixa NM-403) e HD403 (dose alta NM-403).

Figura 8. Alterações bioquímicas nos animais expostos a instilações repetidas de NM-401 e NM-403 após 3, 7, 30 e 90 dias. (A) níveis de ureia em plasma; (B) níveis de creatinina plasmática; e (C) lactato desidrogenase (LDH) em LBA. PS80: grupo polissorbato 80 (0,1%), ASB: grupo asbesto, LD401 (dose baixa NM-401) e HD401 (dose alta NM-401), LD403 (dose baixa NM-403) e HD403 (dose alta NM-403).

Figura 9. Análise histopatológica de tecidos pulmonares corados com hematoxilina e eosina (H&E).

Figura 10. Análise histopatológica de tecidos extrapulmonares corados com hematoxilina e eosina (H&E).

MANUSCRITO II

Figura 1. Dano de DNA em tecido pulmonar dos animais expostos pelo ensaio cometa alcalino.

Figura 2. Razão de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PC/NC) na medula óssea dos animais dos grupos de estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

δ-ALA-D – Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase

ASB – Asbesto

CAT – Catalase

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CVD – Deposição de Vapor Químico

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ERs – Espécies Reativas

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos

GSH - Glutathiona

H&E – Hematoxilina e Eosina

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-10 – Interleucina 10

LBA – Lavado Broncoalveolar

LDH – Lactato Desidrogenase

MDA – Malondialdeído

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MO – Medula Óssea

NTC – Nanotubos de Carbono

NTCPM – Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas

NTCPS – Nanotubos de Carbono de Paredes Simples

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PS80 – Polissorbato 80 (Tween 80)

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento beta

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

PARTE I	21
INTRODUÇÃO	23
1. Nanotubos de carbono.....	25
1.1. Estruturas e tipos de nanotubos de carbono.....	25
1.2. Preparação dos nanotubos de carbono.....	26
1.3. Produção industrial e aplicações.....	27
2. Nanotoxicologia.....	28
3. Avaliação da toxicidade pulmonar de nanocompostos.....	30
4. Principais efeitos e mecanismos de toxicidade.....	31
4.1. Fibrose e inflamação pulmonar	32
4.2. Estresse oxidativo e genotoxicidade.....	34
OBJETIVOS	37
1. Objetivo geral.....	39
2. Objetivos específicos.....	39
PARTE II	41
Manuscrito I: Characterization and <i>in vivo</i> toxicological evaluation of multi-walled carbon nanotubes: a low dose repeated intratracheal administrations study	43
PARTE III	99
Manuscrito II: <i>In vivo</i> pulmonary genotoxicity evaluation of multi-walled carbon nanotubes after repeated exposures.....	101
DISCUSSÃO	117
CONCLUSÕES	127
PERSPECTIVAS	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
ANEXO I	145

PARTE I

1. Nanotubos de carbono

1.1. Estrutura e tipos de nanotubos de carbono

A era da nanotecnologia tem impulsionado o rápido crescimento na pesquisa e desenvolvimento de materiais na escala nanométrica, os quais são tidos como promissores para diversas aplicações em pesquisa e desenvolvimento. Dentre os nanomateriais mais relevantes, destacam-se os nanotubos de carbono (NTC) pelas suas propriedades térmicas, mecânicas, óticas e elétricas, com uma vasta gama de potenciais usos em indústrias eletrônicas, computacionais, aeroespaciais e aplicações biomédicas (ALSHEHRI *et al.* 2016).

Os NTC são alótropos de carbono cuja estrutura cilíndrica é formada a partir de camadas de grafeno, compostas por átomos de carbono em arranjo hexagonal, que são enroladas e podem ser fechadas na extremidade com uma meia molécula de fulereno, conforme mostrado na Figura 1 (VENKATARAMAN *et al.*, 2019).

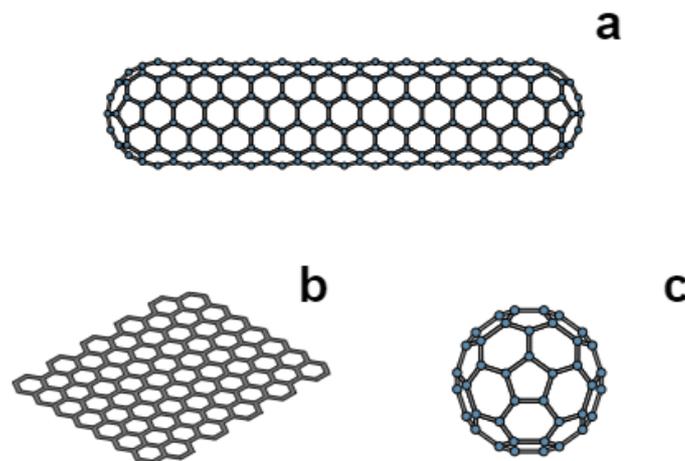


Figura 1. Representação das estruturas constituídas por carbono. (a) estrutura de um nanotubo de carbono de parede simples; (b) estrutura bidimensional do grafeno; (c) fulereno C₆₀.

Esses nanocompostos formados por carbono apresentam diâmetros variáveis situados na escala nanométrica, os quais vão desde 1 nm até dezenas de nanômetros; além disso, os comprimentos também variam até microns, o que acarreta uma elevada razão comprimento/diâmetro. Os NTC podem ser divididos estruturalmente em duas formas: nanotubos de carbono de paredes simples (NTCPS), os quais podem ser entendidos como uma folha de grafeno enrolada sobre si mesma, e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM), formados por um conjunto de camadas concêntricas de grafeno (IJIMA, 1991).

1.2. Preparação dos nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono foram descobertos por Sumio Iijima em 1991 na fuligem produzida após síntese pelo método de descarga por arco, onde ocorre formação de grafite em plasma sob atmosfera de gás inerte e em altas temperaturas (IJIMA, 1991). Desde então, outros métodos vêm sendo utilizados para melhorar a síntese de nanotubos de carbono, como a ablação por laser e a deposição de vapor químico (CVD). Os métodos de descarga por arco e ablação a laser se baseiam na condensação de átomos de carbono a partir de grafite sólido de alta pureza, sendo que as temperaturas utilizadas se aproximam do ponto de fusão do grafite (3.000 a 4.000 °C).

Na descarga por arco, ocorre uma descarga por arco elétrico entre dois eletrodos de grafite (cátodo e ânodo), em uma câmara que contém gás inerte (argônio ou hélio), sendo que a passagem da corrente promove a sublimação do grafite no ânodo com a formação de plasma de grafite, que se deposita no cátodo ou paredes da câmara, onde são encontrados os nanotubos (VENKATARAMAN *et al.*, 2019). Sabe-se que a utilização de metais de transição (Fe, Co, Ni, Y) junto ao grafite no ânodo promove a formação de NTCPS, pelo efeito do catalisador metálico auxiliando o crescimento dos nanotubos (FERREIRA, 2003).

Na ablação a laser, o grafite sólido é vaporizado pela irradiação, usualmente com laser pulsado, em atmosfera contendo gás inerte, de modo que o fluxo de gás arrasta as espécies de carbono, podendo dar origem a NTCPM, quando o grafite puro é submetido à ablação, ou a NTCPS, quando se

misturam metais de transição ao grafite neste processo. Sabe-se que os nanotubos produzidos por ablação apresentam menos impurezas do que na descarga por arco, sendo as impurezas esperadas principalmente partículas de grafite, carbono amorfo, fulerenos e partículas metálicas (FERREIRA, 2003; VENKATARAMAN *et al.*, 2019).

A produção de nanotubos pelo método de CVD vem sendo extensivamente empregada por permitir um melhor controle das variáveis. Este método se utiliza da decomposição térmica de gases precursores, geralmente hidrocarbonetos como acetileno, propileno e etileno, que ocorre em fornos a temperaturas mais baixas (inferiores a 1.000 °C) com a presença de um metal catalisador. Neste processo, os nanotubos são nucleados e crescem a partir dos átomos de carbono decompostos que formam depósitos de carbono (coques) na superfície do catalisador, sem a formação de intermediários aromáticos policíclicos, gerando os filamentos de carbono que crescem associados às partículas metálicas (HERBST *et al.*, 2004; VENKATARAMAN *et al.*, 2019)

Os principais problemas associados aos métodos de produção são a geração de carbono amorfo e a presença de metais como impurezas. No entanto, os processos de síntese catalítica e CVD apresentam vantagens em relação aos demais na otimização dos processos para produção de maior quantidade de nanotubos com baixa quantidade de impurezas (HERBST *et al.*, 2004).

1.3. Produção industrial e aplicações

Em 2014, a produção global de NTC estimada pelas indústrias variou de 520 a 3.000 toneladas, sendo que produção de NTCPM é mais abundante em comparação com os NTCPS (JENSEN *et al.*, 2015). As projeções do crescimento do mercado mundial de nanotubos de carbono indicam uma produção global de 4.000 toneladas em 2023 (GUPTA *et al.*, 2022).

Por conta de suas propriedades mecânicas, elétricas e térmicas, o uso de nanotubos de carbono tem sido descrito para diversas aplicações de interesse industrial. Dentre as numerosas aplicações, verificam-se muitos estudos adotando o uso de NTC em nanocompósitos. Por exemplo, a utilização

de NTC como materiais preenchedores para reforçar matrizes poliméricas, como resinas epóxi (HER *et al.*, 2017), vem sendo adotada para a obtenção de nanocompósitos que apresentam melhor rigidez, força específica, estabilidade dimensional e resistência química, com aplicações promissoras para indústrias aeroespaciais, automobilísticas e de materiais esportivos.

Outro uso nanotecnológico interessante de NTC é no reforço da borracha para aplicação como material selante em reservatórios e na perfuração de poços e reservas profundas de petróleo, no intuito de conferir maior dureza e força ao selante, em conjunto com flexibilidade e estabilidade estrutural nas altas temperaturas e pressões típicas dessas profundidades (DENG *et al.*, 2011).

2. Nanotoxicologia

A Nanotoxicologia é uma subárea da Toxicologia que se ocupa de investigar os efeitos potencialmente tóxicos dos nanomateriais, os quais são definidos como estruturas na escala nanométrica ou de partículas com um diâmetro inferior a 100 nm. Assim sendo, um dos principais objetivos desta área do conhecimento é determinar quais propriedades de nanomateriais específicos acarretam efeitos tóxicos, bem como conceber formas de prevenção e tratamento desses efeitos (SINGH *et al.* 2019).

O tamanho reduzido dos nanomateriais reflete em uma maior área de superfície, o que geralmente está relacionado a um aumento na toxicidade dessas substâncias. Além disso, a sua forma também pode ser um fator que influencia a toxicidade, a exemplo da estrutura fibrilar do asbesto e seus efeitos tóxicos bem documentados. Nesse sentido, o conhecimento acumulado sobre toxicidade de fibras de asbesto levou ao “paradigma da patogenicidade das fibras”, pelo qual se consideram como fatores preponderantes para a patogenicidade dessas estruturas o baixo diâmetro, comprimento e biopersistência nos pulmões.

Fibras muito finas apresentam baixo diâmetro aerodinâmico (D_{ae}), o que implica uma maior eficiência da deposição pulmonar, de modo que fibras com diâmetros abaixo de 1 μm são consideradas respiráveis por se depositarem além do epitélio ciliado. Já o comprimento de fibras acima de 15 μm indica uma

fagocitose dificultada pelos macrófagos. Neste contexto, fibras longas e biopersistentes induzem fagocitose incompleta ou frustrada, ativação celular e reduzida eliminação, com o desenvolvimento de inflamação, fibrose e alguns tipos de câncer, como o mesotelioma localizado no espaço pleural. Já as fibras longas e não biopersistentes irão se dissolver ou quebrar de modo a serem eliminadas pelos macrófagos (DONALDSON *et al.*, 2013).

Partindo-se dessas premissas, os nanotubos de carbono apresentam seus diâmetros normalmente abaixo de 100 nm, morfologia tubular e alta razão comprimento/diâmetro. Nesse sentido, os NTC apresentam características que podem influenciar sua toxicidade, como tamanho e forma, além de serem essencialmente estruturas grafiticas, o que indica que não serão solúveis em pH neutro ou levemente ácido, portanto, sendo potencialmente biopersistentes (DONALDSON *et al.* 2006).

As avaliações nanotoxicológicas fornecem um apoio à nanotecnologia na busca da avaliação de segurança, com destaque para os estudos de toxicidade pulmonar. O aumento vertiginoso na produção de NTC impulsionou o desenvolvimento de estudos de exposição por via pulmonar, tendo em vista os possíveis riscos de exposição no meio ambiente e no ambiente de produção em escala industrial. Neste contexto, acredita-se que os principais riscos da exposição aos NTC em humanos venham da inalação crônica ocupacional (ASCHBERGER *et al.* 2010).

De fato, a exposição ocupacional aos nanotubos de carbono fez com que fosse estabelecido um limite de exposição recomendado de 1 µg NTC/m³, considerando-se uma jornada de 40 horas semanais e 50 semanas anuais por 45 anos. Ainda, a recomendação é de que se considere todos os tipos de nanotubos de carbono como um perigo respiratório e que as exposições ocupacionais estejam controladas, até que se possa compreender melhor a associação dos efeitos tóxicos dos nanotubos com suas diferenças físico-químicas (NIOSH, 2013).

A regulação sobre nanomateriais em geral vem crescendo mundialmente. As agências FDA e EPA são as principais entidades regulatórias que se ocupam dos assuntos envolvendo nanotoxicidade nos EUA para a liberação de produtos contendo nanomateriais. Similarmente, na Europa estas atribuições são conduzidas pela ERC e pela EURO-NanoTox. Em 2015, iniciou-

se a participação do Brasil no NANoREG, que é uma iniciativa internacional visando apoiar estudos nanotoxicológicos para utilização na tomada de decisões de agências reguladoras, como a Anvisa. Com isso, pretende-se melhorar a regulamentação para a autorização de produtos que tenham nanomateriais incorporados. As atividades brasileiras do NANoREG incluíram diversos grupos de pesquisa no país, tendo sido a presente tese fruto da participação da iniciativa, a qual teve o objetivo de contribuir na investigação de toxicidade em modelo animal através de exposição dos nanotubos de carbono por via pulmonar. Nesse sentido, os protocolos utilizados e os nanomateriais testados seguiram a padronização como forma de se obter dados toxicológicos em conjunto com as diversas instituições participantes.

Em relação à análise para liberação dos produtos com base nanotecnológica, sabe-se que a avaliação de risco tem importantes fatores, como a avaliação de exposição e de segurança. Na avaliação da exposição, inclui-se o estudo da migração das partículas presentes nos produtos acabados, como por exemplo pela sua liberação de materiais compósitos, devido ao fato de que nanocompostos liberados em condições de uso trazem potenciais riscos à saúde humana. Ademais, as agências valorizam estudos de segurança reprodutíveis para avaliação correta da toxicidade de nanocompostos, isto é, através de avaliações nanotoxicológicas (SINGH *et al.* 2019).

3. Avaliação da toxicidade pulmonar de nanocompostos

Os principais tipos de estudos nanotoxicológicos por via pulmonar se baseiam na administração de nanomateriais por inalação e por instilação intratraqueal. Para a realização de estudos de inalação, requer-se uma estrutura bem desenvolvida que conte com câmaras de inalação adaptadas de acordo com o tipo de exposição inalatória pretendida. Além disso, a caracterização da nanopartícula e o controle da estabilidade quando se forma um aerossol e da concentração na câmara de inalação é fundamental durante o tempo de exposição nesses estudos. Tais estudos estão bem descritos em protocolos para avaliação de toxicidade, como o de toxicidade inalatória

subcrônica OECD nº 413 (OECD, 2008), e são utilizados por diversos autores (MA-HOCK *et al.* 2009; PAULUHN, 2010).

Esta abordagem por inalação é muito relevante por representar a deposição fisiológica do nanomaterial respirado. Todavia, ela apresenta alto custo, demanda muito tempo e também grandes quantidades de nanomaterial. Deve-se considerar ainda que a manutenção da dispersão do material no ar é fundamental para a administração por inalação, pois influencia diretamente na dose de material depositada nos pulmões em função do diâmetro aerodinâmico “respirável”. O diâmetro aerodinâmico das partículas é definido como respirável quando, após inalação, as partículas se depositam na região alveolar, onde poderão ocasionar toxicidade, sendo que 50% das partículas com diâmetro aerodinâmico de 4 µm encontram-se na fração respirável (NIOSH, 2013).

A administração por instilação intratraqueal vem sendo utilizada em modelos animais para avaliar a toxicidade de compostos que podem causar dano ao aparelho respiratório, apresentando maior conveniência por não depender de câmaras de inalação, por permitir testes com pequenas quantidades amostras, e por ser mais rápida e apresentar menor custo em relação aos estudos por via inalatória (LAM *et al.* 2004; HOUGAARD *et al.* 2013).

Como desvantagem da via intratraqueal, sabe-se que a via inalatória é considerada mais adequada para testar a toxicidade pulmonar de agentes químicos por mimetizar de forma mais realística a exposição que ocorre nos humanos, enquanto a instilação intratraqueal faz com que o nanomaterial escape do contato com as vias aéreas superiores, atingindo áreas mais distais, e que a velocidade da dose depositada nos pulmões seja muito superior ao processo inalatório, sendo a instilação denominada como bolus por esta característica. No entanto, deve-se levar em conta a impossibilidade de se testar todos os nanomateriais produzidos por estudos de inalação, logo as exposições intratraqueais surgem como importante via de administração para os estudos de toxicidade pulmonar (MORIMOTO *et al.*, 2017).

4. Principais efeitos e mecanismos de toxicidade

Nos últimos anos, tem se tornado crescente na literatura uma gama de relatos sobre a toxicidade de nanotubos de carbono, em diferentes modelos de linhagens celulares e em animais. Dentre os achados nos estudos disponíveis, destacam-se indícios de ativação do processo inflamatório, desenvolvimento de fibrose pulmonar, havendo ainda preocupações em relação à genotoxicidade e carcinogenicidade, principalmente devido à semelhança com as fibras de asbesto que são produtoras de mesoteliomas (LAM *et al.* 2004; DONG, MA, 2015).

Todavia, ainda não houve um consenso a respeito dos efeitos tóxicos sistêmicos e pulmonares, agudos ou crônicos, da exposição aos NTCs, tendo em vista a variedade de tipos, tamanhos, composição, e diferenças físico-químicas dos NTCs estudados para se obter conclusões definitivas sobre estes compostos (LIU *et al.* 2013).

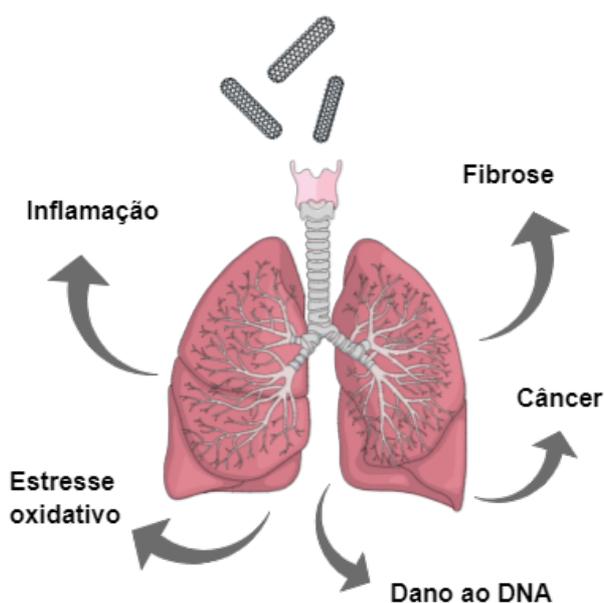


Figura 2. Principais efeitos possivelmente associados à toxicidade dos nanotubos de carbono.

4.1. Fibrose e inflamação pulmonar

A fibrose faz parte do processo regenerativo celular normal que envolve a substituição de células mortas, em decorrência de injúria tecidual, por componentes da matriz extracelular, resultando na cicatrização e formação de

tecido conjuntivo fibroso. No caso de fibrose pulmonar, este processo implica a perda permanente da função fisiológica, através do engrossamento das paredes alveolares e perda dos alvéolos, prejudicando a capacidade de difusão do oxigênio para trocas gasosas no local acometido (MONTANARI, 2016; SHARMA *et al.*, 2016).

O processo se inicia quando o agente tóxico alcança os alvéolos e causa substancial morte celular das células epiteliais. A população de macrófagos alveolares residentes no pulmão, atraídas pelos mediadores liberados pelo tecido lesado, inicia a eliminação do corpo estranho por fagocitose. Ainda, os macrófagos produzem fatores de crescimento, como o FGF, que estimula a proliferação dos fibroblastos produtores de colágeno, bem como produzem TGF β , responsável pela diferenciação em miofibroblastos, os quais produzem colágeno e filamentos de actina associados à miosina, responsáveis pela retração do tecido cicatricial (SHARMA *et al.*, 2016)

Além disso, os neutrófilos também são atraídos ao epitélio lesado e iniciam uma resposta inflamatória, que poderá ser prolongada se não houver a eliminação por fagocitose. A resposta inflamatória é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e IL-8) e influxo de leucócitos, como neutrófilos, monócitos e células T. Os mediadores liberados estimulam a síntese de novas células epiteliais, que sofrem mitoses para restabelecer o revestimento, e de novos vasos capilares que permitem a migração das células de defesa ao local (SHARMA *et al.*, 2016).

Como resultado do processo, mediante a proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos, ocorre aumento na produção fibras de colágeno e demais componentes da matriz extracelular (como fibras reticulares, fibras elásticas e a parte não fibrilar chamada substância fundamental) (MONTANARI, 2016). Com a proliferação excessiva e deposição progressiva de matriz extracelular no septo alveolar, pode ocorrer o espessamento das paredes alveolares com formação de tecido cicatricial fibrótico que identifica a fibrose pulmonar.

O potencial dos NTC induzirem inflamação e fibrose pulmonar vem sendo estudado e atualmente os trabalhos buscam compreender as diferenças que são observadas nos efeitos induzidos por esses nanomateriais em função das suas variadas propriedades físico-químicas. Nesse sentido, há indícios

sugerindo que o comprimento dos nanotubos pode ser um fator relacionado a maior potencial fibrótico (POULSEN *et al.*, 2015). Sabe-se que, devido ao potencial de aglomeração dos NTCPM, a funcionalização de superfície é utilizada como modo de melhorar a dispersão; no entanto, a modificação da superfície também pode aumentar ou diminuir a fibrogenicidade. Outros fatores, como o estado de dispersão e presença de impurezas, também parecem ter influência nos efeitos relatados (SHARMA *et al.*, 2016).

4.2. Estresse oxidativo e genotoxicidade

Os radicais livres ou espécies reativas são moléculas contendo ao menos um par de elétrons desemparelhado, como o ânion superóxido e radicais hidroxila, que são produzidas continuamente pelos sistemas biológicos. Essas moléculas altamente instáveis são envolvidas, quando em baixos níveis fisiológicos, em diversos processos metabólicos e vias de sinalização celular (VALKO, 2007). A homeostase celular ou equilíbrio redox é mantida a partir das defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas e não enzimáticas, e atuam no sentido de manter os níveis fisiológicos de espécies reativas sob controle (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O desequilíbrio entre formação de espécies reativas e sua inativação pelas defesas antioxidantes leva ao estresse oxidativo, condição na qual o excesso de espécies reativas resulta em dano oxidativo a moléculas biológicas, tais como proteínas, membranas lipídicas e o ácido desoxirribonucleico (DNA). Em condições de estresse oxidativo, as funções biológicas das biomoléculas oxidadas são alteradas, de modo que o dano oxidativo acumulado e não regenerado através da ação antioxidante presente nos sistemas biológicos pode levar à morte celular (BUBOLS *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2010). Nesse sentido, biomoléculas como os lipídios, amplamente distribuídos nas membranas celulares, são alvos dos ataques por espécies reativas, sendo os ácidos graxos insaturados particularmente suscetíveis a esse tipo de dano, produzindo os chamados peróxidos lipídicos. Durante esse processo, forma-se o malondialdeído (MDA) que é um produto secundário envolvido na peroxidação lipídica (GARCIA *et al.*, 2013).

Dentre os sistemas antioxidantes, encontram-se os antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, e os antioxidantes não enzimáticos. O tripeptídeo glutathione (GSH) é a principal molécula antioxidante não enzimática que atua como agente redutor, atuando na manutenção da homeostase redox através dos grupos sulfidrílicos (POOLE, 2015).

O envolvimento de estresse oxidativo com os nanotubos de carbono vem sendo demonstrado com o aumento de evidências especialmente sobre o dano lipídico como um importante resultado do desbalanço oxidativo celular e tecidual promovido por nanotubos de carbono. Em estudo *in vivo* após instilação intratraqueal com NTCPM, demonstrou-se redução da capacidade antioxidante e de glutathione, bem como aumento de dano lipídico (REDDY *et al.* 2011). Além disso, considerando-se a relação entre inflamação e a produção de espécies reativas, por exemplo através da ativação enzimática de NADPH oxidase, há estudos apontando efeitos cardiovasculares em decorrência da exposição aos nanotubos de carbono (MØLLER *et al.* 2014; CHRISTOPHERSEN *et al.* 2016).

O DNA também é descrito como um alvo importante afetado pela exposição aos nanotubos de carbono. O nanotubo de carbono com maior quantidade de informação disponível sobre genotoxicidade é o MWCNT-7 ou Mitsui-7, o qual encontra-se classificado pela IARC como possivelmente carcinogênico (Classe 2B) (IARC, 2017). Tal fato estimula o interesse em investigar o potencial genotóxico dos diversos outros tipos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Há diversos estudos *in vitro* relatando a genotoxicidade de nanotubos de carbono em linhagens celulares pulmonares (JACKSON *et al.* 2015; LOURO *et al.* 2016) e trabalhos em animais expostos por via pulmonar indicando a genotoxicidade de nanotubos de carbono, porém os resultados não apresentam relação dose-resposta muito evidente, havendo ainda as diferenças entre os tipos de nanotubos de carbono testados (DONG e MA, 2015; POULSEN *et al.* 2016; HADRUP *et al.* 2017; RAHMAN *et al.* 2017; GATÉ *et al.* 2019).

Outros estudos têm buscado compreender qual o papel das diferentes propriedades físicas e químicas nos efeitos tóxicos ao DNA dos nanotubos de

PARTE II

MANUSCRITO I

Characterization and *in vivo* toxicological evaluation of multi-walled carbon nanotubes: a low dose repeated intratracheal administrations study

Manuscrito aceito para publicação na revista *Environmental Science and Pollution Research*

A Parte II é composta pelo Manuscrito I, tratando-se de artigo aceito para publicação na revista *Environmental Science and Pollution Research*, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 45 a 97.

PARTE III

MANUSCRITO II

***In vivo* pulmonary genotoxicity evaluation of multi-walled carbon nanotubes after repeated exposures**

Manuscrito a ser submetido à revista Mutation Research/Genetic Toxicology
and Environmental Mutagenesis

O texto completo da Parte III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 103 a 116, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da avaliação da genotoxicidade de dois nanotubos de carbono de paredes múltiplas após instilações intratraqueais repetidas, através dos ensaios cometa e teste de micronúcleos.

DISCUSSÃO

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas são um grupo heterogêneo de nanocompostos que apresentam variações em formato, na razão entre comprimento e largura, espessura da parede, presença de contaminantes, funcionalização de superfície, etc (JACKSON *et al.*, 2015; POULSEN *et al.*, 2017), fatores estes que podem determinar diferenças em efeitos toxicológicos entre os NTCPM. Assim sendo, a caracterização físico-química dos nanotubos de carbono se faz necessária para compreender as informações toxicológicas e, portanto, o risco associado à exposição aos diferentes nanotubos de carbono, bem como avaliar as medidas de proteção e vigilância na saúde ocupacional dos indivíduos expostos no ambiente de trabalho.

Este estudo realizou a caracterização físico-química e avaliou a toxicidade após administração pulmonar de nanotubos de carbono manufacturados listados como materiais de referência da OCDE, o que permite um conhecimento da procedência e padronização dos lotes dos nanomateriais e comparabilidade dos resultados de caracterização obtidos em demais estudos.

Estudos de toxicidade pulmonar podem ser feitos através de administrações pela via intratraqueal, a qual é considerada uma boa estratégia para garantir que a dose administrada chegue efetivamente no pulmão, logo permitindo o controle da internalização do material administrado, evitando as perdas que ocorrem pela via inalatória (DRISCOLL *et al.*, 2000). Por outro lado, há desvantagem no que se refere ao procedimento de não ser fisiológico, como o que ocorre na inalação, nem avaliar a exposição do material nas vias aéreas superiores, como a laringe e traqueia, uma vez que o material instilado será direcionado às vias aéreas inferiores (GATÉ *et al.*, 2019).

Outro aspecto contemplado no desenho experimental deste estudo foi realizar instilações repetidas nos animais, o que permite uma simulação melhor das exposições repetidas em ambientes ocupacionais; além disso, foram avaliados os efeitos em diferentes tempos após as exposições, isto é, em períodos recentes (3 e 7 dias) e tardios (30 e 90 dias), permitindo uma avaliação mais detalhada da continuidade dos efeitos avaliados.

Por serem altamente hidrofóbicos, os NTCPM testados foram dispersos com a incorporação de polissorbato 80 a 0,1% no meio dispersante. A utilização de polissorbato 80 como agente dispersante para nanotubos de carbono já foi descrita previamente. KOBAYASHI e colaboradores (2011) realizaram uma preparação bem dispersa de NTCPs utilizando polissorbato 80 a 1% para administração intratraqueal em ratos (KOBAYASHI *et al.*, 2011). Além disso, este mesmo agente foi empregado em outro estudo de instilação em ratos (REDDY, 2012).

Ambos os nanotubos de carbono testados foram caracterizados e comparados com dados de caracterização prévios (JACKSON *et al.*, 2015; RASMUSSEN *et al.*, 2014), apesar do meio dispersante em tais relatos ter incluído soro de ratos ou camundongos, ao passo que no presente estudo substituiu-se o soro por polissorbato 80. De acordo com as análises de MET, diferenças morfológicas evidentes foram observadas entre os NTCPM. O NM-401 apresentou-se como tubos alongados e espessos, enquanto o NM-403 demonstrou estrutura de tubos emaranhados curtos e finos. Estas características morfológicas estão de acordo com os dados disponíveis (RASMUSSEN *et al.*, 2014).

O comportamento em relação ao diâmetro hidrodinâmico em dispersão, para os dois nanotubos, demonstra semelhanças na intensidade de pico nanométrico, apesar do NM-403 ter apresentado outro sinal por volta de 10nm de forma dose-dependente, podendo sugerir que a fração menor, aumentado quanto maior a concentração de nanotubos na dispersão, pode ser decorrente de quebras nos comprimentos dos nanotubos durante a sonicação, o que poderia estar relacionado ao diâmetro menor observado para o NM-403 através de microscopia eletrônica de transmissão.

Os sinais na região micrométrica detectados indicam aglomeração. Os NTCPM apresentam uma característica de aglomerar demonstrada previamente (WANG *et al.* 2011; JACKSON *et al.*, 2015), propriedade esta que é relacionada com as interações van der Waals entre as camadas de carbonos com hibridização sp^2 (TAILOR, 2018). Resultados similares aos apresentados neste trabalho foram relatados por WANG *et al.* (2011), que mostraram um pico na região micrométrica devido às interações hidrofóbicas entre NTCPM, além do pico maior na faixa nanométrica. Além disso, JACKSON *et al.* (2015)

testaram ambos os NTCPM em outro meio dispersante e também observaram aglomeração dos nanotubos em dispersão. Ademais, os dois nanocompostos testados em nosso estudo mantiveram o mesmo padrão de distribuição de tamanho hidrodinâmico, tanto nas análises repetidas quanto no estudo de estabilidade, o que indica que as dispersões permaneceram com adequada estabilidade durante as horas entre a preparação e a administração nos animais.

A espectroscopia Raman é uma análise importante que permite uma avaliação rápida e não destrutiva da estrutura do grafeno em nanotubos de carbono, em que a banda G é relacionada às vibrações planares dos átomos de carbono e a banda D reflete os defeitos na estrutura sp^3 do carbono (TAILOR, 2018). De acordo com os resultados, os espectros dos materiais analisados mostraram elevada similaridade com os dados disponíveis na literatura sobre esses nanotubos de carbono, o que confirma a identidade dos materiais (RASMUSSEN *et al.*, 2014).

As curvas de ganho de peso corporal dos animais nos tempos mais recentes após as exposições demonstraram uma diminuição que pode ser interpretada como sinal de toxicidade geral associada às administrações repetidas. No entanto, esta observação não foi mais constatada após 30 dias das exposições, quando não houve diferença estatística entre os grupos de estudo; após 60 e 90 dias das exposições, houve um aumento de ganho de peso nos grupos expostos em relação aos controles. Esta mudança posterior no ganho de peso relativo dos animais poderia ser explicada por uma compensação ao ganho de peso prejudicado nos períodos mais recentes. Recentemente, KNUDSEN *et al.* (2019) realizaram um estudo com administração intratraqueal única com NM-401 e NM-403, onde não se observaram diferenças no ganho de peso dos animais, apesar de relatarem inflamação pulmonar. No entanto, pode-se atribuir estes achados às diferenças de espécie animal e no protocolo experimental. Adicionalmente, o efeito sistêmico observado pode ser explicado com base no achado de que NTCPM podem se transportar pelo organismo após a administração intratraqueal por translocação pleural (FUJITA *et al.*, 2016).

Os animais expostos a NTCPM apresentaram poucas alterações de peso relativo dos órgãos, mais especificamente diminuições no fígado do NM-

403 na dose alta e rim de ambos os nanotubos em altas doses, após 30 dias e 90 dias das instilações, respectivamente. Redução em peso relativo dos órgãos pode estar relacionada a uma baixa perfusão sanguínea, diminuição de líquido no órgão ou morte celular. Não foram encontradas informações em estudos anteriores sobre peso dos órgãos em relação aos NTCPM testados. Em um estudo prévio, houve aumento de peso do pulmão após instilação de NTCPs, porém não foram relatados dados de outros tecidos (KOBAYASHI *et al.*, 2011).

Há poucos trabalhos que avaliaram marcadores bioquímicos em plasma de ratos expostos por instilação intratraqueal (KAVOSI *et al.*, 2018), e não foi possível localizar estudos que investigaram um conjunto de diversos parâmetros bioquímicos em animais expostos por via intratraqueal aos NTCPM incluídos neste estudo, tendo em vista que os trabalhos disponíveis, em sua maioria, privilegiaram a determinação destes marcadores em LBA ou foram estudos de administração por inalação (MA-HOCK, 2009; PAULUHN, 2010; PORTER *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2011, POULSEN *et al.*, 2015).

KAVOSI e colaboradores (2018) relataram aumento dos níveis de enzimas hepáticas após exposições aos NTCPM, apesar dos autores enfatizarem que os camundongos tratados com NTCPs apresentaram um aumento mais pronunciado das transaminases (KAVOSI *et al.*, 2018). Em nosso estudo, os diferentes NTCPM testados não mostraram sinais de toxicidade hepática através dos marcadores plasmáticos. Todavia, alterações transitórias em marcadores de função renal foram demonstradas após 3 dias das instilações repetidas, uma vez que essas alterações não permaneceram nos tempos mais tardios após as exposições.

Em relação à enzima LDH, diversos estudos investigaram seus níveis em LBA em avaliações de toxicidade pulmonar de diversos NTCPM, principalmente em estudos de inalação (PAULUHN, 2010; JOHANSSON *et al.*, 2017; HADRUP *et al.*, 2017; RAHMAN *et al.*, 2017; GATÉ *et al.*, 2019). Por exemplo, PAULUHN (2010) realizou um estudo de inalação subcrônico de outro tipo de NTCPM e mostrou níveis aumentados de LDH em LBA, o qual é associado a dano pulmonar como resposta às exposições (PAULUHN *et al.*, 2010). Entretanto, há poucos relatos na literatura sobre ambos os NTCPM testados neste estudo.

Demonstrou-se no presente trabalho que os níveis de LDH em LBA foram aumentados após 3 dias das instilações, tanto para NM-401 quanto para NM-403 nas doses altas, apesar desta alteração não se observar nos tempos posteriores. Nossos resultados estão em conformidade com outro estudo recente, ainda que por diferente via de administração, onde foram avaliados os níveis de LDH no LBA, que se encontraram aumentados após 3 dias da inalação com ambos NM-401 e NM-403. Os autores ainda observaram que, após 30 e 180 dias das exposições ao NM-401, houve pouco ou nenhum aumento de LDH, mas após 90 dias foram encontrados aumentos significativos. Em relação ao NM-403 nos demais tempos, apenas pequenas alterações em LDH foram observadas (GATÉ *et al.*, 2019).

Este estudo não apontou alterações hematológicas, tampouco mudanças na atividade da ALA-D nos animais expostos. Os resultados dos hemogramas permaneceram dentro das faixas esperadas e, apesar de ter havido um aumento de CHCM após 3 dias das exposições, não se pode associar este achado isolado com algum distúrbio de relevância clínica.

Recentemente, trabalhos interessantes investigaram um panorama amplo das principais vias afetadas pela exposição aos NTCPM, dentre elas as vias de inflamação, câncer, fibrose e de resposta de fase aguda. Estes estudos apresentam grande importância por orientar quais seriam as principais vias afetadas e os principais efeitos a serem esperados, no entanto não foi possível ainda ampliar estes achados para mais NTCPM ou indicar os componentes proteicos ou celulares mais preponderantes nos danos decorrentes da exposição a esses nanocompostos (POULSEN *et al.*, 2015; FUJITA *et al.*, 2016; POULSEN *et al.*, 2017). Por outro lado, está bem demonstrado na literatura o papel da inflamação pulmonar celular na resposta à exposição aos NTCPM (PAULUHN, 2009, AISO *et al.*, 2010; PORTER *et al.*, 2010). O recrutamento de células inflamatórias no tecido pulmonar vem sendo avaliado em lavado broncoalveolar de animais expostos como parte do conjunto de análises dos principais estudos padronizados de inalação, bem como de estudos de instilação pulmonar.

Outros mecanismos alvos de interesse quando se trata de exposição aos nanotubos de carbono incluem dano ao DNA e estresse oxidativo. Dentre as vias conhecidas de estresse oxidativo, destaca-se a formação de um

produto gerado no ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) às membranas lipídicas, denominado malondialdeído (MDA), que é, portanto, utilizado como um biomarcador de dano lipídico (GARCIA *et al.*, 2013). Demonstrou-se neste estudo que os níveis de MDA estavam aumentados 3 dias após as exposições e que o dano lipídico não permaneceu nos tempos pós-exposição posteriores. Similarmente, os níveis de MDA investigados em outro estudo foram aumentados após 24 h de uma única administração intratraqueal realizada com outros tipos de NTCPM. Assim como no nosso trabalho, em períodos subsequentes, o dano lipídico reduziu, apesar dos autores terem encontrado ainda algum nível de dano lipídico nas doses mais elevadas após 3 meses (REDDY *et al.*, 2011).

A produção aumentada de EROs é também responsável por causar oxidação de grupos tiólicos, levando à formação de produtos que podem ser regenerados através de agentes redutores presentes nas células como a glutathiona. De fato, o tripeptídeo GSH é a principal molécula de baixo peso molecular contendo grupos tióis, a qual está envolvida de forma ubíqua em processos biológicos de equilíbrio redox (POOLE, 2015). Observou-se no grupo NM-401 após 3 dias das exposições um aumento de GSH concomitante ao aumento de MDA. Os dados nos levam a concluir que, durante o período das instilações repetidas, deve ser iniciado o processo de estresse oxidativo, possivelmente em conjunto com uma esperada depleção de glutathiona, o que pode ter desencadeado um efeito compensatório para aumentar as reservas de GSH, de modo que tais reservas tiveram um aumento imediatamente após o final das administrações. Há um entendimento na literatura de que a quantidade de glutathiona produzida pelas células é muito superior à necessária para sequestrar EROs, o que reforça o papel da GSH em outras funções celulares. Outro aspecto é que uma pequena fração da glutathiona é oxidada por meio das espécies reativas, havendo na maioria das condições um rápida recuperação e síntese de GSH para que se tenha a renegeração da fonte tiólica para compensar os danos (BOYSEN, 2017).

Há ainda preocupação no que se refere aos efeitos genotóxicos ou mesmo o desenvolvimento de câncer. Esta preocupação se dá em face do NTCPM chamado MWCNT-7 ou Mitsui-7, o qual é um nanotubos longo (> 5µm) e espesso (90 nm) já classificado pela IARC como possivelmente

carcinogênico para humanos (Grupo 2B), apesar de não haver evidências a respeito dos demais NTCPM, que continuam não classificáveis em relação a carcinogenicidade aos humanos (IARC, 2017). Os nanotubos de carbono aqui testados e avaliados após 3 dias da última instilação repetida não apresentaram sinais de dano ao DNA através do ensaio cometa alcalino ou pelo teste de micronúcleos. Ainda assim, continua sendo necessário que mais trabalhos se dediquem a investigar a genotoxicidade e outros mecanismos celulares afetados por nanotubos de carbono para que se possa tirar maiores conclusões a respeito da toxicidade após exposições pulmonares a esses nanocompostos.

Com base nos dados deste estudo, pode-se concluir que os NTCPM testados induziram, após 3 dias das exposições, alterações sistêmicas e pulmonares, transitórias e persistentes, que se apresentaram no período mais recente após as instilações e algumas permaneceram com o aumento do tempo após exposição. As constatações de pesos relativos hepáticos e renais reduzidos podem indicar que algum grau de dano tecidual pode ter se instalado posteriormente, uma vez que foram vistas nos tempos mais tardios após as exposições, devendo, portanto, ser avaliadas em conjunto com os achados isolados de alterações histológicas desses órgãos, bem como em mais estudos, para conclusões mais definitivas sobre dano tecidual persistente. De qualquer maneira, os resultados apontam para a ocorrência de dano extrapulmonar após as instilações intratraqueais após tempos mais prolongados, o que está de acordo com estudos de biodisponibilidade dos nanotubos de carbono em que se aponta a translocação dos nanotubos acumulados nos pulmões para a pleura e linfonodos, de onde podem se distribuir para órgãos distais como fígado, rins e baço (JACOBSEN *et al.*, 2017).

Por fim, é relevante considerar que a dose alta testada no presente trabalho corresponde ao limite de exposição recomendado pela NIOSH para nanotubos de carbono de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, estimado para exposição de trabalhadores de 40 horas semanais por 45 anos (NIOSH, 2013; GATÉ *et al.*, 2019), na qual algumas alterações transitórias puderam ser constatadas, bem como as alterações teciduais persistentes. Nesse contexto, os resultados obtidos contribuem para elucidar mais sobre os efeitos tóxicos envolvidos após

exposições pulmonares repetidas nas doses administradas dos dois NTCPM. Considerando que se tratam de nanomateriais produzidos industrialmente, existe ainda muito espaço para se estudar individualmente os nanotubos de carbono ou até mesmo revisar os limites de exposição. Ainda que os efeitos tóxicos observados tenham se apresentado transitórios nas condições experimentais, outros efeitos foram persistentes, como o dano tecidual pulmonar.

CONCLUSÕES

- ❖ Os nanotubos de carbono NM-401 e NM-403 foram bem caracterizados na forma sólida e nas dispersões, apresentando adequada estabilidade para administração;
- ❖ Os dois nanotubos de carbono testados apresentaram toxicidade sistêmica e pulmonar após instilações repetidas;
- ❖ Os marcadores bioquímicos renais e de estresse oxidativo apontam para danos transitórios no período recente após as exposições intratraqueais, quando comparados ao controle veículo;
- ❖ Os animais expostos apresentaram sinais de toxicidade sistêmica transitória, comparados ao controle veículo, através da redução no ganho de peso, observado no período próximo ao final das exposições pulmonares;
- ❖ O dano pulmonar foi observado pelo aumento da liberação de LDH após 3 dias das exposições a ambos os nanotubos de carbono testados, comparados ao controle negativo.
- ❖ Houve dano pulmonar em ambos os tipos de NTCPM na análise histopatológica, dentre eles espessamento do septo alveolar, granuloma, pontos hemorrágicos e fibrose.
- ❖ A ocorrência de alterações histológicas extrapulmonares e a redução do peso relativo dos tecidos hepáticos e renais indicam a ocorrência de dano em tempos mais prolongados após as exposições.
- ❖ Os nanotubos de carbono não demonstraram genotoxicidade após 3 dias das exposições pulmonares através da análise de dano ao DNA no tecido pulmonar e em medula óssea.

PERSPECTIVAS

- ❖ Avaliar a genotoxicidade em mais tempos após as administrações intratraqueais em relação ao ensaio cometa em tecido pulmonar e do teste de micronúcleos em amostra de medula óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HALLAK, M.H.D.K. et al. Pulmonary Toxicity of Polysorbate-80-coated Inhalable Nanoparticles; In vitro and In vivo Evaluation. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 294-299, 2010.

ATCHUDAN, R. et al. Synthesis of high-quality carbon nanotubes by using monodisperse spherical mesoporous silica encapsulating iron oxide nanoparticles. **Korean J Chem Eng**, v. 36, p. 157-165, 2019.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BOYSEN, G. The Glutathione Conundrum: Stoichiometric Disconnect between Its Formation and Oxidative Stress. **Chem Res Toxicol**, v. 30, n. 5, p. 1113-1116, 2017.

BUBOLS, G.B. et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini Rev Med Chem**

FUJITA, K., et al. Pulmonary and pleural inflammation after intratracheal instillation of short single-walled and multi-walled carbon nanotubes. **Toxicology Letters**, v. 257, p. 23-37, 2016.

GARCIA, S.C. et al. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. **Drug Chem Toxicol**, v. 36, n. 3, p. 306-312, 2013.

GATÉ, L. et al. Pulmonary toxicity of two different multi-walled carbon nanotubes in rat: Comparison between intratracheal instillation and inhalation exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 375, p. 17-31, 2019.

GIKNIS, M.L.A; CLIFFORD, C.B. (2006). Clinical Laboratory Parameters for CrI:CD(SD) Rats. Charles River Laboratories. Disponível em: https://www.criver.com/sites/default/files/resources/rm_rm_r_clinical_parameter_s_cd_rat_06.pdf. Acesso em: setembro 2022.

GROTTO, D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v. 43, p. 619-624, 2007.

GUPTA, S.S. et al. Do Carbon Nanotubes and Asbestos Fibers Exhibit Common Toxicity Mechanisms? **Nanomaterials (Basel)**. v. 12, n. 10, p. 1708, 2022.

HADRUP, N. et al. Influence of dispersion medium on nanomaterial-induced pulmonary inflammation and DNA strand breaks: investigation of carbon black, carbon nanotubes and three titanium dioxide nanoparticles. **Mutagenesis**, v. 32, n. 6, p. 581-597, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **New York, (Capítulos 3, 4, 5)**, 2007.

HER, S.C.; LIN, K.Y. Dynamic mechanical analysis of carbon nanotube-reinforced nanocomposites. **J Appl Biomater Funct Mater**, v. 15, n. Suppl. 1, p. e13-e18, 2017.

HERBST, M.H. et al. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Quím. Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.

HOUGAARD, K.S. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. **Reprod Toxicol**, v. 41, p. 86-97, 2013.

HOJO, M. et al. Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. **Part Fibre Toxicol**. v. 19, n. 1, p. 38, 2022.

IARC, 2017. Some Nanomaterials and Some Fibres. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France, Volume 111. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/larc->

[Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Nanomaterials-And-Some-Fibres-2017](#). Acesso em: setembro 2022.

IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

JACKSON, P. et al. Validation of freezing tissues and cells for analysis of DNA strand break levels by comet assay. **Mutagenesis**, v. 28, n. 6, p. 699-707, 2013.

JACKSON, P. et al. Characterization of genotoxic response to 15 multiwalled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta(TM) mouse lung epithelial cell line. **Environ Mol Mutagen**, v. 56, n. 2, p. 183-203, 2015.

JACOBSEN, N.R. et al. Biodistribution of carbon nanotubes in animal models. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 121, n. 3, p. 30-43, 2017.

JENSEN, K.A., 2014. The ENPRA dispersion protocol for NANoREG. Version 1.0. Disponível em: <http://safenano.re.kr/download.do?SEQ=174> Acesso em: setembro 2022.

JENSEN, K.A., 2015. NRCWE SOP for measurement of hydrodynamic Size-Distribution and Dispersion Stability by Dynamic Light Scattering (DLS). Disponível em: http://portal.s2nano.org:8282/files/DLS_Protocol_nanoReg.pdf. Acesso em: setembro 2021.

JENSEN, K.A. et al., 2015. The Danish Environmental Protection Agency. Carbon Nanotubes. Types, Products, Market, and Provisional Assessment of the Associated Risks to Man and the Environment. Environmental Project No. 1805. Disponível em: <https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2015/12/978-87-93352-98-8.pdf>. Acesso em: setembro 2021.

JOHANSSON, H.K.L. et al. Airway exposure to multi-walled carbon nanotubes disrupts the female reproductive cycle without affecting pregnancy outcomes in mice. **Part Fibre Toxicol**, v. 14, n. 1, p. 17, 2017.

KAVOSI, A. et al. The toxicity and therapeutic effects of single-and multi-wall carbon nanotubes on mice breast cancer. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8375, 2018.

KNUDSEN, K.B. et al. Physicochemical predictors of Multi-Walled Carbon Nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after pulmonary deposition of 11 different Multi-Walled Carbon Nanotubes in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 124, n. 2, p. 211-227, 2019.

KOBAYASHI, N. et al. Pulmonary and systemic responses of highly pure and well-dispersed single-wall carbon nanotubes after intratracheal instillation in rats. **Inhal Toxicol**, v. 23, n. 13, p. 814-828, 2011.

KURODA, C. et al. The Dispersion State of Tangled Multi-Walled Carbon Nanotubes Affects Their Cytotoxicity. **Nanomaterials (Basel)**, v. 6, n. 11, p. 219, 2016.

LAM, C.W. et al. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. **Toxicol Sci**, v. 77, n. 1, p. 126-134, 2004.

LIU, Y. et al. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. **Acc Chem Res**, v. 46, p. 702-713, 2013.

LOURO, H. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. **Toxicol Lett**, v. 16, n. 262, p. 123-134, 2016.

MA-HOCK, L. et al. Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. **Toxicol Sci**, v. 112, n. 2, p. 468-481, 2009.

MOHANTA, D. et al. Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces. **J Pharm Anal**, v. 9, p. 293-300, 2019.

MØLLER P, et al. Role of oxidative stress in carbon nanotube-generated health effects. **Arch Toxicol**, v. 88, n. 11, p.1939-64, 2014.

MONTANARI, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto/>. Acesso em: agosto 2022.

MORIMOTO, Y. et al. Significance of Intratracheal Instillation Tests for the Screening of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials. **J UOEH**, v. 39, n. 2, p. 123-132, 2017.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2011. Environment, housing, and management. In Guide for the care and use of laboratory animals. Washington (DC): National Academy Press. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/12910/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals-eighth>. Acesso em: setembro 2022.

NIOSH, 2013. Current Intelligence Bulletin 65: Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. DHHS (NIOSH), Publication number 2013-145, p. 1-184. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/default.html>. Acesso em: setembro 2022.

OBERDÖRSTER, G. et al. Inhalation Exposure to Carbon Nanotubes (CNT) and Carbon Nanofibers (CNF): Methodology and Dosimetry. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 18, n. 3-4, p. 121-212, 2015.

OECD, 2008. Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a Revised Guideline 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study.

Environment Directorate, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/62/28/41460877.pdf>. Acesso em: setembro 2022.

PAULUHN, J. Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. **Toxicological Sciences**, v. 113, p. 226–242, 2010.

POOLE, L.B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. **Free Radic Biol Med**, v. 80, p.148-157, 2015.

PORTER, D. W. et al. Mouse pulmonary dose-and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. **Toxicology**, v. 269, p. 136–147, 2010.

POULSEN, S.S. et al. MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 284, n. 1, p. 16-32, 2015.

POULSEN, S.S. et al. Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 9, p. 1263-1275, 2016.

POULSEN, S.S. et al. Multi-walled carbon nanotube-physicochemical properties predict the systemic acute phase response following pulmonary exposure in mice. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0174167, 2017.

RAHMAN, L. et al. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 823, p. 28-44, 2017.

RASMUSSEN, K. et al. 2014. Multi-walled Carbon Nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403: Characterization and Physico-Chemical Properties. Publications Office of the European Union. Disponível em: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC91205>. Acesso em: setembro 2022.

REDDY, A.R. et al. Evaluation of oxidative stress and anti-oxidant status in rat serum following exposure of carbon nanotubes. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 59, n. 2, p. 251-257, 2011.

REDDY, A.R., et al. Pulmonary toxicity assessment of multiwalled carbon nanotubes in rats following intratracheal instillation. **Environ Toxicol**, v. 27, n. 4, p. 211-219, 2012.

SALEEMI, M.A. et al. Toxicity of Carbon Nanotubes: Molecular Mechanisms, Signaling Cascades, and Remedies in Biomedical Applications. **Chem Res Toxicol**, v. 34, p. 24-46, 2021.

SASSA, S. δ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, p. 133-145, 1982.

SHARMA, M. et al. Predicting pulmonary fibrosis in humans after exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). **Arch Toxicol**, v. 90, n. 7, p. 1605-1622, 2016.

SIMON, J., FLAHAUT, E., GOLZIO, M. Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. **Materials (Basel)**, v. 12, n. 4, p. 624, 2019.

SINGH, A.V. et al. Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. **Toxicol Mech Methods**, v. 29, n. 5, p. 378-387, 2019.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

TAILOR, P.M. et al. Simulation of the Raman spectroscopy of multi-layered carbon nanomaterials. **Phys Chem Chem Phys**, v. 20, n. 44, p. 28001-28010, 2018.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

YAMASHITA, K. et al. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. **Inflammation**, v. 33, n. 4, p. 276-280, 2010.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VENKATARAMAN, A. et al. Carbon Nanotube Assembly and Integration for Applications. **Nanoscale Res Lett.**, v. 14, n. 1, p. 220-266, 2019

YAMASHITA K. et al. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. **Inflammation**, v. 33, n. 4, p. 276-280, 2010

WANG, X. et al. Multi-walled carbon nanotube instillation impairs pulmonary function in C57BL/6 mice. **Part Fibre Toxicol**, v. 8, p. 24, 2011.

