UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento de culturas tridimensionais de células e sua aplicação na
avaliação de biocompatibilidade de materiais poliméricos

Glaucia Cristina Mello Santos

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2012

Glaucia Cristina Mello Santos

Desenvolvimento de culturas tridimensionais de células e sua aplicação na
avaliação de biocompatibilidade de materiais poliméricos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2012.

*A Deus,
por estar comigo sempre,
ensinando-me, corrigindo-me, protegendo-me,
concedendo-me muito mais do que necessito*

*Ao meu esposo Roni,
por sempre me mostrar que era possível,
por acreditar em mim mais do que eu mesma
pela compreensão e amor constantes*

Agradecimentos

À Deus, por estar presente em minha vida, por dar a mim condições e forças para cada dia de estudo, dando-me paz e tranquilidade nos momentos difíceis e esperança em todo o tempo.

Ao meu esposo Roni, que é uma grande inspiração de determinação e persistência. Amor, obrigada por existir em minha vida e dividir seus momentos comigo. Amo você.

Aos meus pais, Hudson e Angela, sempre tão amorosos e cuidadosos. Obrigada por compartilharem comigo dos meus sonhos, sempre me incentivando e apoiando. Vocês são os melhores.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos, sogros e amigos pela torcida e apoio.

À minha professora orientadora, prof^a Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, que sempre depositou em mim confiança e tem sido para mim um exemplo.

Às professoras Silvia Berlanga de Moraes Barros e Silvy Stuchi Maria Engler, pela oportunidade de poder desempenhar meus experimentos juntamente com sua equipe, pelo carinho com o qual me receberam, por todos os conselhos e sugestões. Por compartilharem comigo de materiais, células, conhecimento, tempo, paciência, enfim, obrigada por toda ajuda. Muito, muito obrigada.

À prof^a. Nadia Araci Bou Chacra e ao amigo Guilherme Tavares, por todo o auxílio e conhecimento que compartilharam comigo e que diante de tanta dedicação, contagiaram-me numa admiração ainda maior pela nanotecnologia.

À prof^a. Iolanda Midea Cuccovia, pela oportunidade da utilização do equipamento Zetasizer, fundamental para a caracterização das nanopartículas, e aos seus colaboradores, Mariana, Márcia e Felipe, no auxílio da utilização do equipamento.

Ao prof^o Ernani Pinto e ao pós-doutorando Ronaldo pela oportunidade da utilização do liofilizador do Laboratório de Ficotoxinas.

Aos amigos que ganhei no Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Camila, Raquel, Manoela, Paula Anastácia, Renato, Paula Penacchi, Erika, Diogo, Andrea, Kelly, Fernanda, Bianca, Carla, Mari, Taissa, Rafaela, Thalita, Silvana. Queridos, obrigada pelos momentos maravilhosos que pude desfrutar com vocês, pelas conversas, discussões, risos... Pela compreensão de me aceitarem como parte da família.

Ao pós-doutorando Denis, pelo auxílio na utilização do Coulter do Laboratório de Polímeros da Faculdade de Engenharia Química.

À analista Renata, pelo auxílio na realização dos ensaios utilizando o Citômetro de Fluxo.

Ao analista Adir, pelo auxílio na visualização da nanopartícula no Microscópio Eletrônico de Varredura, do Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da USP.

Às analistas do CONFAR, Cleide, Diane, Sueli e Glaucia, pela amizade sempre presente.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro.

A todos que colaboraram para que a conclusão de mais esta etapa fosse possível.

RESUMO

SANTOS, G. C. M. **Desenvolvimento de culturas tridimensionais de células e sua aplicação na avaliação de biocompatibilidade de materiais poliméricos.** 2012. 127p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

Materiais poliméricos têm sido usados em um vasto número de aplicações médicas e farmacêuticas, caracterizando-se como biomateriais. Antes do uso humano, se faz necessário uma criteriosa programação de testes que permitam investigação da segurança do material e avaliação da eficácia e assim, avaliar sua biocompatibilidade. Essa atenção também tem sido aplicada a materiais nanoparticulados, inclusive de constituição polimérica. Sendo assim, antes da liberação destes materiais para uso humano, testes preliminares são feitos *in vitro* e *in vivo*, neste caso com experimentação animal. Paralelamente à crescente busca em se manter a segurança biológica, a ciência tem procurado metodologias alternativas para se obter resultados seguros e que possam substituir os obtidos *in vivo*. Neste contexto, surge grande interesse no uso de culturas celulares, primeiramente em monocamadas e posteriormente, o desenvolvimento de culturas celulares em estrutura tridimensional, mimetizando de maneira mais próxima o que ocorre *in vivo*. Considerando as diversas vantagens obtidas no estudo de culturas tridimensionais, este estudo teve como objetivo desenvolver tal modelo, visando simular sistemas de avaliação para biocompatibilidade de materiais poliméricos, testando nanopartículas de polibutílcianoacrilato. Foram cultivadas células de fibroblasto e melanócito humanos e células de melanoma (SK-Mel-103) em monocamada e em matriz tridimensional de colágeno tipo I e avaliada a citotoxicidade em 24, 48 e 72 horas das nanopartículas utilizando os testes de Exclusão Azul de Tripan e MTT. Os resultados indicam que as nanopartículas de polibutílcianoacrilato são mais citotóxicas com o aumento da concentração da amostra, assim como o IC_{50} foi decrescente ao longo dos dias, demonstrando a intensificação da resposta biológica no decorrer do tempo e foram mais citotóxicas para as células de melanoma. Este perfil de aumento de citotoxicidade com o passar do tempo também foi observado no ensaio clonogênico, onde as células foram cultivadas em monocamada e incubadas com a amostra até 14 dias. Os testes de

viabilidade celular em cultura tridimensional evidenciaram faixa de IC_{50} um pouco maior do que em monocamada, demonstrando uma pequena redução na citotoxicidade quando avaliada no ambiente 3D. Foram feitos testes de caracterização do tipo de morte utilizando citometria de fluxo, confirmando os dados dos testes de viabilidade que indicam aumento de morte com o aumento da concentração de teste. A morte acontece por apoptose tardia. Nas concentrações próximas ao IC_{50} , há indicação que as nanopartículas de polibutílcianoacrilato inibem a autofagia em fibroblastos e células de melanomas cultivados em monocamada, característica que é anulada quando o comportamento é avaliado em ambiente tridimensional. Os resultados indicam que nanopartículas de polibutílcianoacrilato podem levar a modificação da resposta celular dependendo da concentração empregada e do ambiente de cultivo das células, mostrando serem promissores o estudo e o emprego de ambiente tridimensional na avaliação de citotoxicidade de nanopartículas poliméricas.

Palavras-chave: cultura celular, tridimensional, nanopartícula, polibutílcianoacrilato, biocompatibilidade.

ABSTRACT

SANTOS, G. C. M. **Development of three-dimensional cell cultures and their application on evaluation of polymeric materials biocompatibility.** 2012. 127p. Thesis (Doctorate) – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, 2012.

Polymeric materials have been widely used as biomaterials in medical and pharmaceutical applications. Before their use in humans, a number of tests is necessary to investigate the safety and effectiveness of the biomaterial in order to determine its biocompatibility. This attention has been given to nanoparticulate materials, including those of polymeric composition. Thus, *in vitro* and *in vivo* preliminary tests are done before these materials are released for human use. In parallel with the concern with biological safety studies, there has been a continuous effort in finding alternative methods to replace the current *in vivo* animal tests and provide reliable results regarding safety. In this context, great interest arises in the use of cell culture, firstly as monolayer and secondly as three-dimensional cell culture systems that mimic more closely the *in vivo* morphology. Taking into account all the advantages of three-dimensional cell culture studies, the aim of this work is to develop a three-dimensional model that can effectively evaluate polymeric biomaterials biocompatibility using polybutylcyanoacrylate nanoparticles. Cell culture of human fibroblasts, melanocytes and melanoma cells (SK-Mel-103) were cultured in monolayer and on type I collagen matrix. Polybutylcyanoacrylate nanoparticles cytotoxicity was evaluated in 24, 48 and 72 hours using Tripán Blue and MTT assays and the results found were dose and time-dependent to all cell types. Moreover, melanoma cells were significantly more sensitive to the nanoparticles toxicity. The same profile of cytotoxic response was observed in the clonogenic assay, where cells were cultured in low-density monolayer and incubated with the nanoparticles for 14 days. Cell viability assays in 3D culture had a slightly higher IC_{50} range when compared to the monolayer results, which suggests a reduction in the nanoparticle cytotoxicity in the 3D environment. Cell death analysis using flow cytometry confirmed the dose-dependent response obtained by cell viability assays. Cell death occurred mostly via late apoptosis. There is suggestive evidence that treatment with polybutylcyanoacrylate nanoparticles in concentrations close to the IC_{50} inhibits autophagy in fibroblasts and melanoma cells when cultured in monolayers, but this

response could not be observed in the 3D environment. Our results showed that polybutylcyanoacrylate nanoparticles can modify cell response depending on the concentration used and the conditions of cell culture. We conclude that the 3D cell culture is a promising method for the evaluation of polymeric nanoparticles cytotoxicity.

Keywords: cell culture, three-dimensional, nanoparticle, polybutylcyanoacrylate, biocompatibility.

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revisão da Literatura	24
2.1. Biomateriais	24
2.1.1. Fatores capazes de alterar a biocompatibilidade de biomateriais ..	28
2.1.2. Respostas biológicas possíveis diante de biomateriais	30
2.2. Materiais poliméricos	31
2.2.1. Polímeros biodegradáveis	33
2.2.1.1. Poli(alquilcianoacrilato)	35
2.3. Nanotecnologia e suas aplicações no campo biomédico	37
2.4. Avaliação experimental de biocompatibilidade	40
2.5. Análise comparativa entre testes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	43
2.6. Análise comparativa entre culturas celulares em monocamada e tridimensionais	45
2.7. Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> de nanopartículas.....	47
3. Objetivos	49
4. Material e Métodos	50
4.1. Material	50
4.1.1. Nanopartículas de polibutilcianoacrilato e de poli- ϵ -caprolactona	50
4.2. Métodos	50
4.2.1. Obtenção, caracterização e esterilização das nanopartículas	50
4.2.1.1. Obtenção das nanopartículas	50
4.2.1.1.1. Polibutilcianoacrilato	51
4.2.1.1.2. Poli- ϵ -caprolactona	51
4.2.1.2. Esterilização das nanopartículas	52
4.2.1.3. Caracterização das nanopartículas	53
4.2.2. Cultura celular	53

4.2.2.1. Cultura em monocamada	54
4.2.2.2. Cultura tridimensional: Equivalente dérmico	55
4.2.2.3. Cultura tridimensional de células de melanoma	56
4.2.2.4. Cultura tridimensional: Melanoma sobre equivalente dérmico	57
4.2.3. Avaliação de citotoxicidade	57
4.2.3.1. Teste de avaliação do metabolismo celular com MTT	58
4.2.3.2. Teste de viabilidade celular com Azul de Tripan – células em monocamada	58
4.2.3.3. Teste de viabilidade celular com Azul de Tripan – células em estrutura tridimensional	60
4.2.4. Testes para avaliação do tipo de morte celular	61
4.2.4.1. FACS (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) para identificação do tipo de morte celular	62
4.2.4.2. Quantificação de vacúolos autofágicos por citometria de fluxo	64
4.2.5. Ensaio clonogênico	65
5. Resultados e Discussão	66
5.1. Síntese das nanopartículas	66
5.1.1. Polibutilcianoacrilato	66
5.1.2. Poli- ϵ -caprolactona	72
5.2. Avaliação de citotoxicidade	72
5.2.1. Teste MTT	73
5.2.1.1. Nanopartículas de polibutilcianoacrilato	73
5.2.1.2. Nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona	81
5.2.2. Teste Azul de Tripan	83
5.2.2.1. Nanopartículas de polibutilcianoacrilato	83
5.2.2.1.1. Cultura em monocamada de fibroblasto, melanócito e melanoma	83
5.2.2.1.2. Cultura tridimensional: Equivalente dérmico.....	91

5.2.2.1.3. Cultura tridimensional de células de melanoma.....	93
5.2.2.1.4. Cultura tridimensional: Melanoma sobre equivalente dérmico.....	95
5.3. Testes para avaliação do tipo de morte celular	96
5.3.1. FACS (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) para identificação do tipo de morte celular	96
5.3.2. Quantificação de vacúolos autofágicos por citometria de fluxo	103
5.4. Ensaio Clonogênico	109
6. Conclusões.....	111
7. Referências Bibliográficas	112
 Anexos	
Anexo I - Tabela de Seleção de Testes para Dispositivos de Superfície	125
Anexo II – Tabela de Seleção de Testes para Dispositivos de Comunicação Extracorpórea	126
Anexo III – Tabela de Seleção de Testes para Dispositivos Implantáveis	127

LISTA DE ABREVIATURAS

AAMI	Association for the Advancement of Medical Instrumentation
ANSI	American National Standards Institute
ASTM	American Society for Testing and Materials
DME	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HEPES	Ácido (4-2-hidroxietyl)-1-piperazine etanossulfônico
ISO	International Organization for Standardization
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Polietileno
PEG	Polietilenoglicol
PMMA	Polimetilmetacrilato
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoretileno ou Teflon
PVC	Poli(cloreto de vinila)
SFB	Soro fetal bovino
TSB	Tryptic Soy Broth
USP	United States Pharmacopeia
UVC	Ultravioleta C

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Polímeros mais amplamente usados que constituem nanopartículas projetadas como carreadores de fármacos	39
Tabela 2	Descrição dos valores obtidos quanto ao tamanho médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de polibutílicoacrilato, sendo amostra original (conforme obtida sem ser submetida a qualquer processo de esterilização); amostra autoclavada; amostras submetidas a luz ultravioleta por 15 e 30 minutos.....	66
Tabela 3	Descrição dos valores obtidos quanto ao tamanho médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de polibutílicoacrilato, assim como indicação do tempo máximo em que as características das nanopartículas foram analisadas em relação a data de sua obtenção. Amostras analisadas das nanopartículas obtidas sem serem submetidas a qualquer processo de esterilização e da amostra submetida a luz ultravioleta por 15 minutos	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma de biocompatibilidade adaptado a partir do FDA <i>Blue Book Memorandum # G95-1</i>	42
Figura 2	Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de polibutilcianoacrilato, (A) liofilizadas e (B) amostra líquida depositada em lâmina de vidro e seca a temperatura ambiente de $(25\pm 3)^{\circ}\text{C}$	69
Figura 3	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutilcianoacrilato em linhagem de fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutilcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Os gráficos A, B e C referem-se aos resultados obtidos nas Semanas 1, 2 e 3, respectivamente. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).....	75
Figura 4	Efeito citotóxico das nanopartículas de polibutilcianoacrilato em linhagem de fibroblasto isolado de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutilcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Gráfico com dados de viabilidade celular (%) dos fibroblastos incubados com diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de polibutilcianoacrilato. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).....	77
Figura 5	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutilcianoacrilato em cultura de melanoma (SK-Mel 103). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutilcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Gráfico com dados de viabilidade celular (%) das células de melanoma incubadas com diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de polibutilcianoacrilato. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).....	78
Figura 6	Placa de 96-well utilizada no teste de MTT. Com o aumento da concentração de nanopartículas de polibutilcianoacrilato, a coloração dos poços se torna menos intensa, indicando uma menor formação de cristais de formazan. Diferença observada entre os tipos celulares	79

	(fibroblasto e melanoma). As células de melanoma demonstram perfil mais suscetível à amostra.....	
Figura 7	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílcianoacrilato em cultura de melanócito (FM 305). Resultados de viabilidade celular (%) e IC ₅₀ (µg/mL) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Gráfico com dados de viabilidade celular (%) das células de melanócito incubadas com diferentes concentrações (µg/mL) de nanopartículas de polibutílcianoacrilato. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais (p<0,01, Teste t-Student).....	81
Figura 8	Efeito citotóxico da nanopartícula de poli-ε-caprolactona em fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de poli-ε-caprolactona na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Gráficos com dados de viabilidade celular (%) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT com diferentes concentrações (µg/mL) de nanopartículas de poli(ε-caprolactona). Os gráficos A e B referem-se aos resultados obtidos nas Semanas 1 e 2, respectivamente. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais (p<0,01, Teste t-Student).....	82
Figura 9	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílcianoacrilato em fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC ₅₀ (µg/mL) a partir dos valores referentes à contagem de células vivas e mortas obtidos no Teste com Azul de Tripán estão descritos. Os gráficos A e B referem-se aos resultados obtidos nas Semanas 1 e 2, respectivamente. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais (p<0,01, Teste t-Student).....	84
Figura 10	Perfil de proliferação de fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2) incubados com nanopartículas de polibutílcianoacrilato em diferentes concentrações (µg/mL). A e B indicam dados referentes às Semanas 1 e 2, respectivamente	86
Figura 11	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílcianoacrilato em fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X.....	87
Figura 12	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílcianoacrilato em células de melanoma (SKMel-103). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100,	87

	Nikon), aumento de 10X.....	
Figura 13	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutilcianoacrilato em melanócitos isolados de cultura primária (FM 305). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutilcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X.....	88
Figura 14	(A) Perfil de proliferação de fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2), melanoma (SK-Mel-103) e melanócitos isolados de cultura primária (FM 305) incubados com nanopartículas de polibutilcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de fibroblastos, melanoma e melanócito. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).....	90
Figura 15	Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutilcianoacrilato em cultura tridimensional de fibroblasto (FP#2) – equivalente dérmico. Resultados de viabilidade celular (%) e IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos valores referentes à contagem de células vivas e mortas obtidos no Teste com Azul de Tripán estão descritos. (A) Perfil de proliferação de fibroblastos em cultura tridimensional incubados com nanopartículas de polibutilcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de fibroblastos em cultura tridimensional. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).....	92
Figura 16	(A) Perfil de proliferação de células de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional (matriz de colágeno tipo I) incubadas com nanopartículas de polibutilcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). A tabela indica os valores de IC_{50} ao longo dos dias.....	94
Figura 17	(A) Perfil de proliferação de células de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional (equivalente dérmico) incubados com nanopartículas de polibutilcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). A tabela indica os valores de viabilidade celular (%) e a indicação dos valores de IC_{50} ao longo dos dias.....	96
Figura 18	(A) Caracterização do tipo de morte celular de fibroblastos cultivados em monocamada, incubados com diferentes concentrações de	98

	nanopartículas de polibutílcianoacrilato (100 e 142µg/mL) em comparação com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).....	
Figura 19	(A) Caracterização do tipo de morte celular de células de melanoma cultivadas em monocamada incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílcianoacrilato (80, 93 e 104 µg/mL) comparados com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).....	99
Figura 20	(A) Caracterização do tipo de morte celular de células de fibroblasto cultivadas em ambiente tridimensional (equivalente dérmico) incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílcianoacrilato (100 e 150 µg/mL) comparados com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).....	100
Figura 21	(A) Caracterização do tipo de morte celular de células de melanoma cultivadas em ambiente tridimensional incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílcianoacrilato (80, 100 e 125 µg/mL) comparados com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).....	101
Figura 22	Diagramas obtidos pela passagem de colágeno no citômetro de fluxo após marcação, evidenciando que o colágeno é marcado pela Anexina V, emitindo fluorescência.....	101
Figura 23	Histograma indicativo da influência da voltagem utilizada no citômetro de fluxo na resposta da emissão da fluorescência dos marcadores ligados ou não ao colágeno.....	103
Figura 24	Gráficos obtidos na citometria de fluxo para fibroblastos cultivados em monocamada que indicam no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.....	105
Figura 25	Gráficos obtidos na citometria de fluxo para fibroblastos em cultura tridimensional que indicam no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.....	106
Figura 26	Gráfico obtido na citometria de fluxo para células de melanoma em monocamada que indica no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando	107

	processo autofágico.....	
Figura 27	Gráfico obtido na citometria de fluxo para células de melanoma em cultura tridimensional que indica no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.....	108
Figura 28	Fotografias das placas P100 com células de fibroblasto e melanoma incubadas durante 14 dias com diferentes concentrações ((10-50)µg/mL) de nanopartículas de polibutílcianoacrilato e a indicação do número de colônias, conforme o caso.....	110

1. Introdução

O corpo humano é vulnerável, estando seus tecidos e órgãos sujeitos a doenças e injúrias que podem levar à dor, perda da função, restrição dos movimentos, podendo acarretar, inclusive, incapacidade. Para permitir que as funções desempenhadas sejam mantidas, em muitos casos, o tratamento envolve a remoção do tecido ou órgão afetado e sua substituição por um enxerto de tecido vivo ou um análogo artificial. Materiais utilizados em dispositivos médicos, particularmente em aplicações nas quais o dispositivo em contato é temporariamente inserido ou permanentemente implantado no corpo, são tipicamente descritos como biomateriais (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

Com base nessa definição, é possível compreender que há oportunidade para um vasto campo de conhecimento interdisciplinar conduzindo estudos colaborativos abrangendo diferentes especialidades, com o objetivo de desenvolver e usar os biomateriais na medicina e odontologia. Dessa forma, há intensa investigação direcionada à síntese, otimização, caracterização, análise de biomateriais e à biologia de interação entre organismo e materiais. Tais estudos são planejados visando projetar superfícies que suscitem interações adequadas com células e proteínas, em conformidade com aplicações específicas, ou seja, que sejam materiais biocompatíveis, para não trazer danos ao paciente (ANDERSON, 2008; WILLIAMS, 1987).

Efeitos adversos causados por dispositivos biomédicos são frequentemente devidos a entidades químicas tóxicas produzidas por componentes do material, contaminantes ou produtos de degradação que se deslocam do dispositivo para o paciente e causam efeitos biológicos desfavoráveis. A extensão pela qual um material precisa ser caracterizado depende do tipo de material usado, da finalidade de uso do dispositivo, do local de aplicação no paciente e da função do material (CHIELLINI, 2006). Dentre os diferentes biomateriais encontram-se os metais, compósitos, as cerâmicas, vidros e polímeros convencionais ou nanoestruturados. Todos os materiais estudados e aplicados no campo protético devem ser submetidos ao *screening in vitro* antes dos testes *in vivo*. O uso de animais para testes de toxicidade de rotina é foco de um segmento da sociedade assim como de regulamentações restritivas em muitos

países. Consequentemente, nos últimos 30 anos houve uma ampla quantidade de pesquisas com foco no desenvolvimento de metodologias alternativas *in vitro*. Normas têm sido publicadas como referência para contato direto de culturas celulares, buscando avaliar o potencial citotóxico de materiais para uso médico (CANNAS; MASSE; PIGATTO, 1995; ISO 10993-5, 2003). Experimentos com células em cultura representam uma importante ferramenta para caracterizar os eventos que possibilitam às células superar o controle normal, identificar as bases genéticas e os processos fenotípicos que estão envolvidos na transformação celular e comparar o comportamento coletivo de linhagens celulares normais e cancerosas (VILELA et al. 2003).

Atualmente, materiais poliméricos têm recebido grande atenção em uma ampla variedade de aplicações desde a área de eletrônicos ao campo ambiental e biomédico. E durante as duas últimas décadas, avanços significativos têm sido feitos no desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis para aplicações biomédicas. Biomateriais poliméricos degradáveis são candidatos de preferência para o desenvolvimento de dispositivos terapêuticos tais como próteses temporárias, estruturas porosas tridimensionais como *scaffolds* para engenharia tecidual e como veículos de liberação controlada/permanente de fármacos. Cada uma dessas aplicações demanda materiais com propriedades físicas, químicas, biológicas, biomecânicas e de degradação específicas para permitir uma terapia eficiente. Consequentemente, uma ampla faixa de polímeros naturais ou sintéticos capazes de serem sujeitos a degradação pelo caminho hidrolítico ou enzimático está sendo investigada para aplicações biomédicas (NAIR, LAURENCIN, 2007).

Os poli(alquilcianoacrilatos) formam a maior classe de polímeros acrilatos biodegradáveis usados para aplicações biomédicas, sendo um dos primeiros polímeros biodegradáveis usados no desenvolvimento de nanopartículas para aplicação em liberação de fármacos (NAIR, LAURENCIN, 2007). Devido ao alto índice de polimerização, estes monômeros têm sido investigados como adesivos teciduais. Várias pesquisas têm sido feitas com nanopartículas de polibutílicoacrilato como veículo de liberação de fármacos seguindo estudos por Couvreur na década de 70. Com os avanços obtidos na nanotecnologia e no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis

com potencial para uso inclusive nos sistemas de liberação de fármacos, é fundamental o estudo dos seus possíveis efeitos tóxicos.

Sendo assim, métodos atuais *in vitro* para avaliação de biocompatibilidade de polímeros são revisados com novos conceitos e técnicas que aparentam promissoras para o desenvolvimento e melhoria de métodos *in vitro*, com a proposta da redução de experimentação animal. A utilização de dispositivos médicos, por exemplo, tem sempre sido subordinada à avaliação de sua biocompatibilidade. Este aspecto, assim como os métodos para avaliação da biocompatibilidade tem mudado ao longo dos anos como um resultado de novos desenvolvimentos em biologia celular que tem revolucionado técnicas *in vitro* para análise de materiais poliméricos para bioaplicações (CHIELLINI, 2006).

Os procedimentos dos testes de biocompatibilidade presentes na USP 34 e também na Farmacopéia Brasileira (5ª edição, 2010) são planejados para detectar as características físicas ou químicas, não-específicas, biologicamente reativas, de produtos médicos ou de materiais usados em sua construção. Em combinação com testes químicos, estes procedimentos biológicos podem ser usados para detectar e identificar a toxicidade inerente ou adquirida de correlatos previamente ou durante sua fabricação e processamento.

A aplicação de alguns dos testes varia de acordo com o material, a natureza do mesmo e a duração do seu contato com o corpo. Sendo assim, a Norma ISO 10993-1:2003 foi idealizada e descreve os princípios gerais que regem a avaliação biológica dos dispositivos médicos, a sua categorização tendo por base a natureza e duração do seu contato com o corpo e a seleção de testes adequados.

A aprovação dos testes *in vitro* tem crescido nos últimos anos, principalmente por vantagens relacionadas à sensibilidade, reprodutibilidade, custos e pressão da sociedade quanto aos estudos *in vivo*. Porém, ainda se tem mantida uma posição cautelosa, tendo em vista a importância e necessidade do estudo *in vivo*. Há um reconhecimento de que culturas de células e tecidos podem prover muitas informações importantes considerando a compatibilidade básica dos materiais. Entretanto, quando a performance de um sistema implante completo deve ser avaliado, testes *in vitro* devem ser complementados com testes *in vivo* (CANNAS; MASSE; PIGATTO, 1995).

Para os defensores dos estudos *in vitro*, como Goldberg (1987), apresentam-se como vantagens de sua aplicação: as técnicas para avaliação de toxicidade aguda e crônica e de mutagenicidade *in vitro* são mais sensíveis e específicas que aquelas *in vivo*; as condições experimentais podem ser melhor padronizadas e os testes *in vitro* são geralmente mais rápidos e baratos.

Simulando a situação *in vivo*, é desejável que os tecidos *in vitro* permitam transporte de nutrientes, estabilidade mecânica, coordenação de processos multicelulares e um microambiente celular que preserve a estabilidade fenotípica das células. O fenótipo e função de células individuais são altamente dependentes de interações com proteínas da matriz extracelular e células vizinhas organizadas tridimensionalmente. Assim, grande interesse tem sido dado ao desenvolvimento de culturas tridimensionais de células, onde se projetam tecidos com características arquiteturais em escalas macro (cm) e micro (aproximadamente 100 micra), e onde as técnicas de cultura celular foram adaptadas sobre *scaffolds* com as arquiteturas tridimensionais (3D) definidas em escalas relevantes ao sucesso fisiológico do tecido (TSANG; BHATIA, 2006). O tecido projetado é composto normalmente de células primárias ou imortalizadas que são reconstituídas e cultivadas na superfície ou no interior de um *scaffold* tridimensional (3D) composto de matriz extracelular protéica ou de análogos biomateriais. O objetivo de usar o tecido projetado na pesquisa biomédica é construir uma relação entre a cultura celular bidimensional (2D) tradicional e a condição *in vivo*, adotando células cultivadas em um ambiente que mais proximamente representa a complexa estrutura 3D do tecido nativo, onde as células têm a oportunidade de crescer cercadas pela matriz extracelular e pelas células vizinhas, nas direções x, y, e z (PETERSEN et al., 2007). Em alguns casos, se cultivadas em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz de outro tipo celular (BENYA; SHAFFER, 1982). Assim, perde-se a funcionalidade do tecido, como é observado em cultura de cartilagem em monocamadas, onde os condrócitos perdem a diferenciação transformando-se em fibroblastos, e passam a produzir colágeno tipo I (MOROZ et al., 2009).

Sendo assim, mostra-se importante o estudo comparativo das respostas celulares diante de testes de biocompatibilidade *in vitro*, avaliando culturas celulares em monocamada e distribuídas em estrutura tridimensional, de forma a permitir aquisição de conhecimento quanto a limitações e vantagens de cada sistema. Dessa forma, o presente estudo visa simular situação investigativa empregando não apenas sistemas 2D, mas também 3D, que permite respostas mais próximas às de sistemas *in vivo*, sem, no entanto, incluir experimentação animal.

Dentre os biomateriais de conotação inovadora, situam-se de forma preponderante aqueles nanoestruturados, representando desafio importante. Desta forma, optou-se por direcionar os estudos a este segmento. Quanto aos demais biomateriais, embora ainda merecendo pesquisas complementares, em grande parte foram já submetidos a estudos clínicos e inclusive, por vezes, apresentam uso consagrado. Consideração adicional consiste no fato de que modelos de avaliação dirigidos aos nanoestruturados, suas vantagens e limitações poderão facilmente ser a eles estendidos.

Optou-se por iniciar os estudos com nanopartículas de polibutílcianoacrilato pois, embora existam estudos sobre elas, apresentam perfil citotóxico não previamente avaliado sob a abordagem proposta, o que torna atraente que seja avaliado comparativamente nos modelos de cultura celular deste estudo. Esta abordagem deverá permitir avaliar as diferenças de respostas diante de efeitos tóxicos do material e assim, permitir elementos que conduzam, com bases científicas, a especificar o modelo ideal de estudo *in vitro*.

2. Revisão de Literatura

2.1. Biomateriais

Uma das definições atuais diz que biomateriais são “materiais (sintéticos ou naturais; sólidos ou, às vezes, líquidos) utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos” (RATNER et al., 2004) enquanto que na definição clássica biomaterial é “qualquer substância (exceto um fármaco) ou combinação de substâncias, que pode ser usada por qualquer período de tempo, como um conjunto ou como uma parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS; TWEDEN, 1995; BORETOS; EDEN, 1984; WILLIAMS, 1987).

Os biomateriais são empregados na obtenção de dispositivos que substituam uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (HENCH; ERTHRIDGE, 1982; PARK; LAKES, 2007). Biomateriais consistem em materiais usados para substituir partes de sistemas ou agir em contato íntimo com tecidos vivos (PARK; LAKES, 2007; WONG; BRONZINO, 2007). A Clemson University Advisory Board for Biomaterials definiu formalmente um biomaterial como sendo “uma substância sistêmica e farmacologicamente inerte designada para implantação ou incorporação com sistemas vivos”. Black (1992) definiu biomateriais como “materiais não viáveis usados em dispositivos médicos, com a finalidade de interagir com sistemas biológicos”. Outros autores incluem “materiais de origem sintética ou natural em contato com tecido, sangue e fluidos biológicos, destinados ao uso em próteses, diagnóstico, terapia, aplicações de armazenamento sem afetar adversamente o organismo e seus componentes” (BRUCK, 1980).

O fator mais importante que distingue um biomaterial de qualquer outro material é a capacidade em existir em contato com tecidos do corpo humano sem causar um grau inaceitável de dano a este corpo. A maneira pela qual a coexistência aceitável entre biomateriais e tecidos é desenvolvida e mantida tem sido alvo de crescente

interesse e estudos ao longo dos anos. Com isso, tem sido elucidadas várias formas de interação entre materiais e tecidos, inclusive aquelas em que a coexistência pode ser comprometida. Há também a pesquisa baseada nos conhecimentos adquiridos sobre essas interações para se obter biomateriais que sejam capazes de promover o melhor desempenho em dispositivos médicos, sendo então, materiais biocompatíveis (WILLIAMS, 2008).

A definição de biocompatibilidade inclui que o material deve apresentar dentre os atributos de qualidade ser atóxico, não promover alergenicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e não exercer influência sobre a fertilidade de um paciente que o utilize (ROGERO et al., 2003). Porém, é importante considerar que a resposta de um material específico pode variar de um sítio de aplicação para outro, estando a biocompatibilidade não apenas relacionada às características do material, mas também com a situação na qual um material é usado. Este conceito foi mudando ao longo do tempo quando inclui que o material deva reagir especificamente com o tecido em questão, em vez de ser ignorado por este tecido, como é o requisito de um material inerte. Entretanto, esta reação deve ser apropriada para a aplicação do biomaterial (WILLIAMS, 2008). Sendo assim, a biocompatibilidade refere-se à habilidade de um material atuar com uma resposta esperada apropriada em uma situação específica (WILLIAMS, 1987). A chave para o entendimento de biocompatibilidade é a determinação de quais são os mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos, dentre outros, que estão atuando, e por que estão atuando, sob condições associadas altamente específicas com contato entre biomateriais e os tecidos do corpo, e também determinar quais são as conseqüências destas interações (WILLIAMS, 2008). Assim, biocompatibilidade não é só definida pela ausência de citotoxicidade de um material, mas também pela biofuncionalidade do material, que o capacita a suportar interações célula-biomaterial de acordo com o local e a situação organo-específica onde o material é aplicado (RICKERT et al., 2006). O biomaterial com características de biofuncionalidade leva a promoção de processos biológicos que contribuem para o objetivo pretendido da aplicação do biomaterial (WANG et al., 2004). Sendo assim, a avaliação de biocompatibilidade com culturas celulares é dependente de quais são os testes mais adequados à aplicação específica do material, dado que um substrato

nunca é totalmente passivo e sempre afeta o ambiente celular (CROWNINSHIELD, 1988; SPECTOR; CEASE; TONG-LI, 1989), e que há sempre uma complexa interação entre células e tecidos e o biomaterial no sítio do implante.

Uma variedade de produtos é usada no tratamento de doenças ou injúrias. Exemplos comuns são suturas, agulhas, cateteres, placas, etc. O emprego desses produtos inclui substituição de partes anatômicas com perda de função devido à doença ou trauma, auxílio na cura, desenvolvimento de função e correção de anormalidades funcionais ou problemas estéticos. Sendo assim, podem ser usados em aplicações em contato com sangue tais como dispositivos extracorpóreos que removem e retornam sangue do corpo, dispositivos que são inseridos no vaso sanguíneo ou aqueles que são permanentemente implantados. Outra aplicação pode ser no aumento do tecido mole, ou então em aplicações ortopédicas e dentárias para reparo e substituição de articulações, ossos e dentes. Há também aplicações orgânicas específicas (por exemplo, neural), como dispositivos adesivos (polímeros que aderem ao tecido natural ou mucosa) ou como *scaffolds* em engenharia tecidual para substituição de tecidos e órgãos e até mesmo como veículos de liberação de fármacos em tamanho nano ou micro (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008; NAIR, LAURENCIN, 2007; PEPPAS, LANGER, 1994). Dentre os diferentes tipos de biomateriais encontram-se os metais, as cerâmicas, os compósitos, os vidros e os polímeros (HELMUS; TWEDEN, 1995).

Os biomateriais metálicos compreendem metais e suas ligas, entre os quais titânio e suas ligas, ligas de cobalto-cromo, ouro, aço inoxidável. Apresentam como características alta força tensil e resistência ao desgaste, mas podem sofrer corrosão, são densos e de difícil processamento. Podem ser empregados em substituição de articulações, fixação ortopédica, placas do osso e parafusos, implantes dentários, fios de sutura (PARK; LAKES, 2007).

As cerâmicas e vidros são, no geral, altamente biocompatíveis, possuem alta resistência à corrosão, mas são frágeis, possuem baixa força tensil e não são resilientes. Podem ser empregados em implantes dentários e ortopédicos. As cerâmicas implantáveis foram intituladas biocerâmicas e são agrupadas em três categorias baseadas em seu comportamento biológico em certos ambientes: as cerâmicas relativamente bioinertes, as cerâmicas bioreativas ou com superfície reativa e as

cerâmicas biodegradáveis ou reabsorvíveis. As cerâmicas relativamente bioinertes são cerâmicas contendo carbono não-absorvível, alumina, zircônia e nitretos de silício. Em contato com o ambiente biológico do local de implante, mantêm suas propriedades físicas e mecânicas. São usadas nas formas densas e porosas, geralmente possuem boa resistência e são excelentes para funções de deslizamento. São usadas para produzir, por exemplo, substituintes da cabeça do fêmur. São usadas tipicamente como implantes de suporte estrutural. As cerâmicas bioativas incluem vidros, cerâmicas-vidros e materiais baseados em fosfato de cálcio. São caracterizadas pela habilidade em provocar respostas ósseas e teciduais no seu entorno, o que lhes confere vantagem na fixação do implante ou redução do estresse. Têm sido usadas com sucesso como revestimento, em camadas e partículas de encaixe nas cirurgias ortopédicas e dentárias. Por fim, as biodegradáveis incluem fosfato de cálcio, alumínio, coralina, hidroxiapatita e fosfato tricálcico. São mais solúveis que as bioativas e, conseqüentemente degradadas pelos tecidos que as envolvem. Devido a sua estrutura porosa, podem estimular o crescimento tecidual. Têm sido usadas na fabricação de vários implantes ortopédicos (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

Os compósitos são materiais formados de dois ou mais constituintes com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separados por uma interface. O objetivo principal em se produzir compósitos é de combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários. Alguns exemplos de compósitos são as fibras de carbono-resina termofixa, fosfato de cálcio-colágeno, os quais apresentam como vantagem a inércia, resistência à corrosão e alta força de tensão, mas são difíceis de produzir. Podem ser empregados na confecção de válvulas cardíacas, implantes de juntas de joelho, resina dentária, cimento ósseo (PARK; LAKES, 2007; WONG; BRONZINO, 2007).

Tendo em vista o fato de cada tipo de biomaterial possuir características específicas, eles são empregados de acordo com a função que vão desempenhar, buscando similaridade àquela do órgão ou tecido que está substituindo, tratando ou ampliando. Sendo assim, materiais mais rígidos como metais são utilizados na substituição de tecidos de sustentação como ossos, enquanto alguns polímeros são

empregados em tecidos moles, como no caso do silicone em relação à mama (GEBELEIN; KOBLITZ, 1981)

2.1.1. Fatores capazes de alterar a biocompatibilidade de biomateriais

As propriedades desejadas do material a ser usado como biomaterial são determinadas pela aplicação específica do dispositivo e do tempo de uso, que varia de temporário a implante de uso crônico. Como esses materiais são planejados para uso em contato com tecidos vivos, condição imprescindível é a esterilidade do produto, sem alterar sua biocompatibilidade, e ausência de endotoxinas bacterianas.

Dentre os processamentos a que são submetidos, é desejável que o último seja o de esterilização, ou seja, o conjunto de operações que objetiva destruir ou inativar todas as formas de vida, incluindo esporos bacterianos, com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de armazenamento e de utilização do produto. Consiste em aplicar condições que, com elevado nível de garantia e reprodutibilidade, permita a obtenção de produtos livres de todas as formas microbianas viáveis. (AZEVEDO; CRUZ; PINTO, 2006; ROGERS, 2005). O termo esterilidade ou nível de garantia de esterilidade remete à incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização, durante a manutenção e utilização de um produto. Os métodos de esterilização, particularmente aqueles considerados terminais, ou seja, envolvendo cinética de morte microbiana, permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas nos produtos em questão. A sua escolha deve depender da natureza do material e da carga microbiana inicialmente presente nos itens considerados (NOGAROTO; PENHA, 2006).

Com o intuito de se garantir a qualidade de um biomaterial, além de se verificar a esterilidade, na certeza da ausência de formas viáveis e reprodutoras de microrganismos, busca-se a garantia quanto a níveis máximos seguros de endotoxinas, já que a existência de bactérias Gram-negativas pode levar à sua presença no produto (DABBAH; PORTER, 2007).

Endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) de alto peso molecular, componentes da parede celular externa de bactérias Gram-negativas que causam febre e outras ações biológicas, entre as quais uma rápida queda na pressão sanguínea se introduzida no sangue ou tecidos do corpo. Por possuir a endotoxina característica ubíqua na natureza, pelo fato de ser estável e pequena o suficiente para passar através de filtros esterilizantes convencionais, seu controle, principalmente para produtos implantáveis, deve ser rigoroso (ANSI/AAMI ST72:2002). O limite é de 0,5 UE/mL (Unidades de Endotoxina/mL), recomendado pela Food and Drug Administration (FDA, 1987); não mais que 20,0 UE/implante (USP 34, 2011).

Determinados processos aos quais os biomateriais são submetidos podem afetar as propriedades dos dispositivos, afetando sua biocompatibilidade (AZEVEDO; CRUZ; PINTO, 2006).

Para certos grupos de biomateriais, fenômeno de importância sobre a bioresposta é basicamente a cura na presença do dispositivo médico estéril. O resultado deste processo de cura pode ter profundas implicações no sucesso de um dispositivo e pode depender também das propriedades do material, tais como textura, cristalinidade, molhabilidade, superfície química e produtos de degradação. Estas propriedades determinam principalmente a interação entre os materiais e proteínas no ambiente biológico, e subsequentemente, as interações com as células e tecidos (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008; BRASH, 2000). Outra propriedade fundamental de polímeros que tem uma influência significativa na biocompatibilidade é o peso molecular. Muitas propriedades físicas dos materiais poliméricos mudam sistemática e dramaticamente quando o peso molecular do polímero é alterado. A razão básica é que como o peso molecular é alterado, um diferente conjunto de macromoléculas é criado com suas próprias propriedades e características físicas. Consequentemente, propriedades mecânicas tais como força de tensão e de impacto, módulo de elasticidade, dureza e força de ligação devem variar com mudanças no peso molecular (CHIELLINI, 2006).

2.1.2. Respostas biológicas possíveis diante de biomateriais

A resposta biológica aos materiais - por exemplo, inflamação e tromboresistência (tendência de um material reduzir formação de trombos pela formação de coágulos, constituídos de plaquetas e/ou fibrina) – é uma importante consideração no desenvolvimento dos dispositivos médicos. Respostas inflamatórias crônicas resultantes em uma fina cápsula fibrosa e a persistência de células brancas são indesejáveis e podem conduzir a danos ao redor do tecido e falha no dispositivo. Reações de hipersensibilidade podem ocorrer por produtos de corrosão e monômeros residuais, plastificantes, aditivos como antioxidantes, e produtos de degradação. Produtos de degradação que podem exibir efeitos sistêmicos se a dose for alta, podem ser resultantes dos métodos de fabricação ou de esterilização usados, assim como resultantes da degradação por processos tais como hidrólise e oxidação ao longo do tempo. Propriedades como a bioestabilidade, isto é, a capacidade de um material resistir a mecanismos de degradação e manter suas propriedades *in situ*, são bem estudadas, visando atender às aplicações de cada biomaterial (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008). Caso o biomaterial tenha sido projetado para degradar *in vivo*, deve produzir produtos de degradação que atendam aos critérios mencionados para a maioria dos materiais (RICKERT et al., 2006). Contaminação por bactéria, endotoxinas e particulados podem ter profundos efeitos nas respostas inflamatórias. Estas respostas são geralmente questão de manipulação, processamento e corrosão *in vivo*. A ausência ou a especificação de limites rígidos de contaminação bacteriana deve ser designada como uma nova exigência nos materiais do fornecedor. Entretanto, resíduos advindos de corrosão são inerentes a propriedades dos materiais e são um assunto para a seleção de materiais apropriados (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

De forma ampla, todos os biomateriais estão sendo desenvolvidos para manter um balanço entre as propriedades mecânicas do tecido substituído (quando este é o caso) e os efeitos bioquímicos do material no tecido (BASU; NATH, 2009). Sendo assim, a investigação dos potenciais efeitos biológicos causados pela utilização de biomateriais deve ser rigorosa, assim como os métodos de esterilização e de garantia

de ausência de endotoxinas devem contemplar escolha que não altere a biocompatibilidade do biomaterial.

2.2. Materiais poliméricos

O uso de polímeros na área médica se iniciou quase juntamente com o nascimento do campo da ciência de polímeros. Praticamente cada novo polímero sintético descoberto seguia para a via dos estudos em experimentos cirúrgicos logo após sua invenção (GRIFFITH, 2000). Materiais poliméricos foram alvo de crescente interesse ao longo do século 20 e têm sido usados em um vasto número de aplicações médicas e farmacêuticas como implantes ortopédicos, dentários ou mamários, órgãos artificiais, marcapassos, suturas, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares e de contato, dialisadores renais e outros dispositivos, sistemas de liberação controlada de fármacos ou na reconstrução de tecidos. As vantagens principais de biomateriais poliméricos comparados aos materiais metálicos ou cerâmicos são a versatilidade para produzir diversas formas (látex, filme, folha, fibras, líquidos viscosos), o fácil processamento, o custo razoável e a disponibilidade na obtenção de materiais com as propriedades físicas e mecânicas desejadas (WONG; BRONZINO, 2007).

Os átomos constituintes da classe dos polímeros são geralmente átomos de carbono. As ligações com a cadeia principal requer dois dos elétrons de valência de cada átomo, deixando as outras duas ligações disponíveis para adição de uma grande variedade de átomos, moléculas, grupos funcionais, etc. (RATNER et al., 2004). Um polímero é um material de alto peso molecular obtido pela repetição de uma unidade simples (o monômero), por meio de ligações covalentes na cadeia principal com C, N, O, Si, etc. Em algumas situações a repetição é linear, podendo ainda, as cadeias estarem interligadas para formar uma rede tridimensional (PARK; LAKES, 2007).

[illegible]

cadeia apresente ramificações (desde que a ramificação não ligue uma cadeia à outra vizinha) o polímero continua sendo considerado linear. Ex: borracha sintética (neopreno): $\dots[-CH_2-C(CH_3)=CH-CH_2-CH_2-C(CH_3)=CH-]\dots$ Polímeros lineares podem ser fundidos e remodelados sem uma mudança básica em sua estrutura (uma vantagem na fabricação) e são chamados termoplásticos. Podem ser amolecidos pelo calor várias vezes e, ao resfriarem, voltam a apresentar propriedades iniciais semelhantes (RATNER et al., 2004).

Caso as cadeias laterais estejam presentes e façam ligações covalentes entre cadeias, uma estrutura tridimensional é formada, ou seja, um polímero tridimensional ocorre quando a macromolécula se desenvolve em todas as direções, isto é, há ligações entre cadeias adjacentes, através de átomos localizados ao longo da cadeia. Tais estruturas são geralmente resistentes. Esses polímeros dão origem a materiais termofixos ou materiais termoendurecentes. No primeiro caso, pelo menos a última fase de produção da macromolécula deve ser feita simultaneamente com a modelagem do objeto desejado, pois uma vez prontos, esses polímeros não podem ser novamente fundidos pelo calor (um aquecimento excessivo causará a decomposição até a queima do material, mas nunca sua fusão) e conseqüentemente, esses polímeros não podem ser reaproveitados industrialmente na moldagem de novos objetos. Os polímeros termoendurecentes, quando prontos, só podem ser fundidos uma vez, pois, durante a fusão, as moléculas reagem entre si, aumentando a massa molecular do polímero e este, endurecendo, torna-se insolúvel e infusível (RATNER et al., 2004).

Materiais poliméricos podem ser classificados como naturais (aqueles derivados de materiais que ocorrem naturalmente) ou puramente sintéticos. Os naturais incluem a borracha natural, polissacarídeos, celulose, seda e proteínas. Dentre os polímeros sintéticos têm-se polietileno (PE), polipropileno (PP), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS), poli(cloreto de vinila) (PVC), poliéster, politetrafluoretileno ou teflon (PTFE), polivinilpirrolidona (PVP), policarbonatos, poliamidas ou nylons, resinas, silicone e poliuretanos (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005; ŘÍHOVÁ, 1996).

As propriedades requeridas de um biomaterial polimérico são similares às de outros biomateriais. Devem ser biocompatíveis (não carcinogênicos, apirogênicos, atóxicos, e não-alergênicos), passíveis de esterilização (autoclave, calor seco, óxido de

etileno e radiação), apresentar propriedades físicas e mecânicas adequadas (força, elasticidade e durabilidade) e com aplicabilidade em processo de fabricação (WONG; BRONZINO, 2007).

O desenvolvimento de biomateriais poliméricos multifuncionais é visto como uma abordagem importante para solucionar os problemas fisiopatológicos complexos. Envolvem novas tecnologias que claramente requerem pesquisa aplicada e fundamental no campo biomédico, fazendo-se necessária uma cooperação interdisciplinar entre físicos, químicos, engenheiros, biólogos moleculares e cientistas de material para o sucesso do desenvolvimento e aplicação de novos sistemas terapêuticos (RICKERT et al., 2006).

2.2.1. Polímeros biodegradáveis

Biodegradação é geralmente definida como degradação causada pela atividade biológica, podendo ocorrer simultaneamente com, e é algumas vezes iniciada por, degradação não-biológica tais como fotodegradação e hidrólise (PLATT, 2006).

As duas últimas décadas do século 20 viram uma mudança no paradigma de biomateriais bioestáveis aos biomateriais biodegradáveis (degradáveis hidrolítica e enzimaticamente) para aplicações médicas e outras relacionadas. A tendência atual prediz que nos próximos anos, muitos dos dispositivos protéticos usados para aplicações terapêuticas temporárias serão substituídas por dispositivos biodegradáveis que poderiam ajudar o corpo a reparar e regenerar os tecidos danificados. A motivação que rege o desenvolvimento de uma série de novos polímeros sintéticos biodegradáveis e análogos de polímeros naturais é, em parte, devido à emergência de novas tecnologias biomédicas, incluindo engenharia tecidual, medicina regenerativa, terapia gênica, liberação controlada de fármacos e bionanotecnologia, todas as quais necessitam de materiais biodegradáveis em sua elaboração (NAIR, LAURENCIN, 2007).

Assim como qualquer biomaterial, aquele feito de material polimérico biodegradável também deve ser biocompatível. No caso de biomateriais biodegradáveis, sua biocompatibilidade deve ser demonstrada ao longo do tempo. As propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas de um material biodegradável variarão com o tempo, e produtos de degradação podem apresentar diferentes níveis de compatibilidade com o tecido, comparado com o material inicial (NAIR, LAURENCIN, 2007).

Muitos polímeros são sujeitos à hidrólise. Diferentes mecanismos de hidrólise estão geralmente presentes na maioria dos ambientes. Em contraste com a degradação enzimática, onde o material é degradado gradualmente da superfície para dentro, a hidrólise química de um material sólido pode realizar-se em todo o seu corte transversal, exceto com polímeros muito hidrofóbicos (PLATT, 2006). Dependendo da forma de degradação, polímeros degradáveis podem ser classificados em polímeros degradáveis hidroliticamente e polímeros degradáveis enzimaticamente. Também podem ser divididos com base em sua origem, natural ou sintética. A maioria dos polímeros que ocorrem naturalmente sofre degradação enzimática. Polímeros naturais possuem vantagens inerentes tais como bioatividade, a capacidade em apresentar ligantes do receptor à célula, suscetibilidade de desencadear na célula a degradação proteolítica e remodelação natural. Porém, essa bioatividade também traz consigo seu lado negativo, uma vez que possui uma forte resposta imunogênica associada com a maioria dos polímeros, a complexidade associada com sua purificação e a possibilidade de transmissão de doenças. Biomateriais sintéticos, por outro lado, são geralmente inertes, possuem propriedades previsíveis e uniformidade lote a lote e tem vantagem única de possuir perfis de propriedade adaptáveis para aplicações específicas, sendo desprovidos de muitas das desvantagens dos polímeros naturais. No entanto, por estarem disponíveis com uma ampla quantidade de ligações químicas, estão suscetíveis a terem grandemente afetadas sua degradação e outras propriedades derivadas. Sendo assim, se faz necessário observar a aplicação do biomaterial, para assim avaliar as diversidades requeridas em termos de força mecânica, tempo de degradação, propriedades de superfície, parâmetros físico-químicos, grau de ligações cruzadas, presença de grupos funcionais para modificação e marcação, dentre outras

características. Mediante esta avaliação, faz-se a escolha do polímero com base na aplicação pretendida (NAIR, LAURENCIN, 2007; JAIN et al., 2011).

Dentre os polímeros degradáveis hidroliticamente, ou seja, polímeros que tem ligações químicas rompidas hidroliticamente em sua cadeia principal estão os poli(α -ésteres) – poliglicolídeo, polilactídeo, poli(lactídeo-co-glicolídeo), polidioxanona, policaprolactona, poli(trimetileno carbonato), poliésteres bacterianos – os poliuretanos, poli(éster amida), poli(orto éster), polianidridos, poli(alquilcianoacrilatos), polifosfoéster, entre outros. Como exemplos de polímeros degradáveis enzimaticamente e são usados como biomateriais estão proteínas e poli(aminoácidos) – colágeno, poli(aminoácidos) naturais e sintéticos, elastina, peptídeos elastina-*like*, albumina, fibrina – e polissacarídeos (de origem humana e não-humana) (NAIR, LAURENCIN, 2007).

2.2.1.1. Poli(alquilcianoacrilato)

Cianoacrilatos são monômeros acrílicos que polimerizam podendo seguir teoricamente três diferentes mecanismos, polimerização via radical-livre, aniônica ou zwitteriônica. Na prática, as vias aniônica e zwitteriônica são fortemente favorecidas pois são rapidamente iniciadas a temperatura ambiente. Iniciadores clássicos da polimerização aniônica são ânions, bases fracas tais como alcoóis, água e aminoácidos encontrados em tecidos vivos (VAUTHIER et al., 2003a), ou até mesmo água ou umidade natural do ar podem ativar o processo de polimerização, formando então longas cadeias de poli(alquilcianoacrilatos) (DOSSI; STORTI; MOSCATELLI, 2010).

Os poli(alquilcianoacrilatos) não foram empregados como polímeros até o início da década de 80. Porém, desde o início da década de 60, muitos cianoacrilatos foram estudados para uso no campo biomédico, por exemplo, como material embolítico para cirurgia endovascular, como adesivos teciduais (cola cirúrgica para fechamento de pele ferida) e materiais de sutura, com muitas vantagens sobre materiais convencionais em cirurgia de tecido mole e uso na pele. Isso foi possível em função de suas excelentes propriedades adesivas, resultando em ligações de alta força que eles são capazes de

formar com a maioria dos substratos polares (DOSSI; STORTI; MOSCATELLI, 2010; VAUTHIER et al., 2003a).

Essa classe de polímeros possui tempo de degradação menores, na faixa de poucas horas a alguns dias. A velocidade de degradação para estes polímeros depende do comprimento da cadeia do grupo alquil. O menor derivado alquil (metilcianoacrilato), degrada em horas no ambiente aquoso, entretanto, leva a produtos de degradação tóxicos tais como ácido cianoacético e formaldeído, ou por outro mecanismo, o de hidrólise da ligação éster da cadeia lateral alquil do polímero, levando a um alquil(álcool) e a ácido poli(cianoacrílico) (VAUTHIER *et al.*, 2003a). O efeito tóxico tem sido correlacionado com a velocidade de degradação do polímero e a velocidade de liberação dos produtos de degradação (quanto menor a cadeia, mais rápida é a velocidade de degradação). O mecanismo proposto para a citotoxicidade observada consiste da degradação das partículas no meio de cultura e/ou adesão das partículas na membrana celular ou em íntima proximidade com a mesma. A maioria das pesquisas nesta área tem se concentrado nos derivados alquil maiores, tais como octil e isobutilcianoacrilatos. (LEGGAT; SMITH; KEDJARUNE, 2007; LHERM *et al.*, 1992).

Os poli(alquilcianoacrilatos) formam a maior classe de polímeros acrilatos biodegradáveis usados em aplicações biomédicas. Nos últimos anos, uma aplicação para estes polímeros consiste no uso de poli(alquilcianoacrilatos) como carreadores nanoparticulados de fármacos. Estudos que surgiram na década de 80 e que se constituem área de crescente interesse tem buscado aplicações na terapêutica, especialmente em tratamento de cânceres, que geralmente envolve moléculas altamente tóxicas em contato com tecido saudável. Atualmente, nanopartículas de poli(alquilcianoacrilatos) são consideradas o sistema de liberação de fármacos coloidal polimérico mais promissor e já estão em desenvolvimento clínico para terapia do câncer. Esse crescente interesse dá-se em função de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, e evidências de tendência para encapsular vários agentes farmacologicamente ativos, tais como fármacos citotóxicos, antibióticos, peptídeos e genes (ZHANG et al., 2008; NAIR, LAURENCIN, 2007; VAUTHIER et al., 2003a).

2.3. Nanotecnologia e suas aplicações no campo biomédico

Uma das definições a respeito de nanotecnologia apresenta-a como uma área da ciência aplicada focada no *design*, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos em nanoescala. Outra definição caracteriza a nanotecnologia como sendo uma subclassificação da tecnologia em ciência coloidal, biologia, física, química e outros campos científicos e que envolve o estudo de fenômenos e manipulação de material em nanoescala (KARKARE, 2008). Há ainda complementação a estas definições, incluindo o; PINTO conceito que esta tecnologia cria e usa estrutura, dispositivos e sistemas que tenham novas propriedades e funções devido a suas dimensões em escala nanométrica (10^{-9}m), assim como tem a capacidade para controlar ou manipular na escala atômica (FULEKAR, 2010).

Com o intuito de se alcançar novos dispositivos com aplicação em sistemas biológicos, nanotecnologia fundida à biotecnologia originaram a nanobiotecnologia, que na manipulação, estudo, engenharia de nanomateriais, desenvolve biomateriais, nos quais, pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico (SHOSEYOV; LEVY, 2008). Dentre as áreas importantes beneficiadas com a nanobiotecnologia estão a nanomedicina (biologia molecular e genética) (ZHANG, et al., 2007a; BRZOSKA et al., 2004), a física-médica (diagnósticos) (FAROKHZAD; LANGER, 2006), terapêutica (sistema de liberação controlada de fármacos) (SHAPIRA et al., 2011; HASADSRI et al., 2009; PETRI et al., 2007; LOCKMAN et al., 2002; SOPPIMATH et al., 2001), entre outras.

O estudo para se desenvolver formulações que permitam a liberação controlada de fármacos em sítios específicos em faixa de dosagem ótima, resultando no aumento da eficácia terapêutica da droga, efeitos adversos diminuídos e melhora do paciente tem recebido grande atenção nos últimos anos. Neste contexto, nanopartículas possuem considerável interesse, principalmente aquelas constituídas de polímeros biodegradáveis, por permitir alcançar formulações com estas características (ALEXIS et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2002).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro menor que $1\mu\text{m}$. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e

as nanoesferas, que possuem como diferença a composição e a organização estrutural. Dependendo do método de preparação, as nanopartículas (nanocápsulas ou nanoesferas) podem ser obtidas com diferentes propriedades e características de liberação dos agentes terapêuticos encapsulados (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; SAHOO; LABHASETWAR, 2003). Nanocápsulas são uma forma de reservatório de material sólido que envolve um núcleo que é líquido ou semi-sólido à temperatura ambiente (15 – 25°C). Nas primeiras formulações de nanocápsulas, o núcleo era composto de óleo, permitindo assim uma alta carga de encapsulamento de drogas lipossolúveis. Nanocápsulas com um núcleo aquoso capaz de encapsular compostos solúveis em água foram desenvolvidos mais recentemente. O conteúdo das nanocápsulas é determinado pela natureza da fase dispersa da emulsão ou da microemulsão que constituem a base da formulação. Geralmente, o revestimento de polímero que cerca o núcleo é formado graças a polimerização que ocorre na interface entre a fase dispersa e contínua da emulsão ou por precipitação de um polímero pré-formados na superfície das gotículas da emulsão. Assim, as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco (na forma sólida ou líquida) estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (RANGASAMY, 2011; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Por outro lado, as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Para permanecerem sem se aglomerar na dispersão líquida, as nanopartículas, assim como todos os tipos de colóides, precisam ser estabilizadas usando moléculas anfifílicas ou agentes protetores de colóides. A maioria dos polímeros amplamente utilizados na composição de nanocarreadores está descrita na Tabela 1 (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Para a preparação de nanopartículas poliméricas, existem vários métodos descritos, os quais podem ser classificados de uma forma geral, em métodos baseados na polimerização in situ de monômeros dispersos (polimerização em emulsão ou polimerização interfacial) ou na precipitação de polímeros pré-formados. (SCHAFFAZICK et al., 2003; VAUTHIER et al., 2003a). No caso da polimerização, esta segue um mecanismo aniônico, que na presença de iniciadores nucleofílicos como OH-

CH₃O⁻ e CH₃COO⁻ é desencadeada, levando à formação de nanopartículas de baixa massa molecular e de rápida degradação. Para evitar que isto aconteça e produzir nanopartículas de peso molecular maior e mais estáveis, a polimerização deve ser realizada em meio ácido (pH 1,0-3,5), na presença de agentes estabilizadores. O tamanho e a massa molecular das nanopartículas dependem do tipo e concentração do estabilizador e/ou tensoativo utilizados no processo de polimerização, do pH do meio de polimerização, assim como da concentração do monômero e da velocidade de agitação (SOPPIMATH et al., 2001).

Tabela 1: Polímeros mais amplamente usados que constituem nanopartículas projetadas como carreadores de fármacos.

Material	Nome completo
Homopolímeros sintéticos	Poli(lactídeo)
	Poli(lactídeo-co-glicolídeo)
	Poli(épsilon-caprolactona)
	Poli(isobutilcianoacrilato)
	Poli(isohexilcianoacrilato)
	Poli(n-butilcianoacrilato)
	Poli(acrilato) e poli(metacrilato)
Polímeros naturais	Quitosana
	Alginato
	Gelatina
	Albumina
Copolímeros	Poli(lactídeo)-poli(etilenoglicol)
	Poli(lactídeo-co-glicolídeo) - poli(etilenoglicol)
	Poli(épsilon-caprolactona) - poli(etilenoglicol)
	Poli(hexadecilcianoacrilato-co-poli(etilenoglicol) cianoacrilato)
Estabilizadores coloidais	Dextran
	Pluronic F68
	Poli(vinil álcool)
	Tween [®] 20 ou Tween [®] 80

A utilização de poli(butilcianoacrilato) como polímero constituinte de nanopartículas apresenta várias vantagens sobre outros polímeros, como fácil

preparação, elevados índices de obtenção de nanopartículas na mesma faixa de tamanho, ausência de resíduos de solvente e também capacidade do polibutílcianoacrilato em absorver ou encapsular uma ampla faixa de fármacos ou moléculas protéicas (NAIR; LAURENCIN, 2007; VAUTHIER et al., 2003b).

2.4. Avaliação experimental de biocompatibilidade

Diante das crescentes descobertas de novas tecnologias, novos materiais e novas aplicações para uso em dispositivos médicos, as inovações e desenvolvimento de metodologias para garantir a segurança e eficácia dos novos produtos também tem encontrado grande campo em pesquisa. Em se tratando de biomateriais, se faz necessário garantir que eles sejam biocompatíveis. Durante o desenvolvimento de um novo biomaterial, deve existir a preocupação com os possíveis efeitos adversos, que geralmente ocorrem devido a componentes do material, que podem produzir efeitos tóxicos, ou contaminantes, ou até mesmo, produtos de degradação ou lixiviáveis que possam causar efeitos biológicos desfavoráveis (CHIELLINI, 2006). Sendo assim, as metodologias para se testar um novo biomaterial também devem acompanhar todo o avanço tecnológico. Estudos da biocompatibilidade de um material requerem experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo* com o intuito de verificar os efeitos locais e sistêmicos do material nos tecidos e células (RICKERT et al., 2006; PINTO, 1984). Qualquer programa de pesquisa de avaliação em biomateriais deve incluir uma série de testes *in vitro* antes dos testes *in vivo*, como estabelecem as agências regulatórias e protocolos padrões (por exemplo, ISO [International Organization for Standardization], ASTM [American Society for Testing and Materials], USP [United States Pharmacopeia], Farmacopéia Brasileira). Parâmetros ISO são seguidos para selecionar os testes para avaliação biológica de materiais (BASU; NATH, 2009). A extensão dos testes executados para um correlato depende da semelhança e exclusividade do produto em relação aos produtos anteriormente comercializados, da extensão e duração do contato

entre o produto e o paciente e da composição do material do produto (Farmacopéia Brasileira 5ª edição, 2010; USP 34, 2011; ISO 10993, 2003).

A Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) apresenta um fluxograma também presente em outros guias internacionais, com as orientações para comparação de um correlato com outros produtos comercializados anteriormente, cujo objetivo é determinar se os dados disponíveis de correlatos anteriormente comercializados são suficientes para garantir a segurança do correlato em questão. Este fluxograma é apresentado na Figura 1. A Farmacopéia Brasileira apresenta também uma série de tabelas com orientações para identificação dos procedimentos adequados para testes biológicos para cada categoria de biomaterial caracterizada pela extensão do contato (dispositivos de superfície, de comunicação extracorpórea e implantáveis). Tais informações foram, no Brasil, precedidas por Pinto, Kaneko e Pinto (2010). Cada categoria é subcategorizada e subdivida conforme a duração do contato entre o dispositivo e o corpo. As tabelas foram extraídas da Farmacopéia Brasileira e incluídas nos Anexo I a III do presente trabalho para visualização.

É vantajoso ressaltar as diferenças entre testes *in vitro* e testes *in vivo*. Testes *in vitro* são experimentos simulados em escala laboratorial, são rápidos e são obrigatórios como screening inicial. Atualmente, embora os experimentos *in vitro* sejam menos custosos, tais testes, em muitos casos, não fornecem representação apropriada de condições fisiológicas. Os testes *in vitro*, tanto biológicos (cultura celular e orgânica) e não biológicos (corrosão, testes mecânicos, etc.) são efetivos como primeiro passo das avaliações da biocompatibilidade. Por outro lado, experimentos *in vivo* produzem uma melhor aproximação ao ambiente humano, e podem ser considerados o segundo passo, anterior ao uso clínico (BASU; NATH, 2009).

Os testes de biocompatibilidade presentes nos guias tais como USP 34 ou na Farmacopéia Brasileira 5ª edição são planejados com o intuito de detectar características físicas ou químicas, não-específicas e biologicamente reativas, de dispositivos médicos ou de seus constituintes. Em combinação com os ensaios químicos, os processos biológicos podem ser utilizados para detectar e identificar a toxicidade inerente ou adquirida de correlatos, antes ou durante sua fabricação e processamento.

Figura 1: Fluxograma de biocompatibilidade adaptado a partir do FDA *Blue Book Memorandum* # G95-1. (Extraído da Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume 1, 2010, pg. 305)

Os procedimentos utilizados para avaliar a biocompatibilidade de um correlato ou de seus constituintes têm sido classificados em um painel de efeitos biológicos (procedimentos de toxicidade) como citotoxicidade, sensibilização, irritação ou reatividade intracutânea, toxicidade sistêmica aguda, toxicidade subcrônica (toxicidade subaguda), genotoxicidade, implantação, hemocompatibilidade, toxicidade crônica (prolonga em 10% a expectativa de vida do animal teste, ou para mais de 90 dias), carcinogenicidade (potencial para biomateriais e seus produtos de degradação induzirem o crescimento de células malignas), toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento, biodegradação e pirogenicidade (Farmacopéia Brasileira 5^a edição, 2010; USP 34, 2011).

Dentre os testes *in vitro* estão: citotoxicidade (avalia a toxicidade celular, determinando qual material é tóxico em contato com algumas linhagens celulares), genotoxicidade (observa se qualquer mutação genética ocorre nas células em contato direto com a superfície do material) e hemocompatibilidade (avalia a compatibilidade do material com células vermelhas do sangue) (BASU; NATH, 2009). Compreendidos como testes *in vivo*, baseados em ensaios de reatividade biológica *in vivo*, estão: teste de injeção sistêmica (avalia as respostas sistêmicas aos extratos de materiais testados por meio de inoculação em camundongos), teste intracutâneo (avalia as respostas locais aos extratos de materiais testados por meio de inoculação intracutânea em coelhos) e teste de implante intramuscular (avalia materiais plásticos e outros polímeros quando entram em contato direto com tecido vivo) (Farmacopéia Brasileira 5^a edição, 2010).

2.5. Análise comparativa entre testes *in vivo* e *in vitro*

Visando atender às especificações descritas nos padrões fornecidos pelas agências regulatórias, faz-se necessário realizar os testes indicados para cada tipo de biomaterial. A maioria dos experimentos *in vitro* indicados nos guias utiliza linhagens celulares simples, que não refletem a interação tecidual real (envolvendo múltiplos tipos

celulares) *in vivo*. Os testes *in vivo* podem analisar as respostas de diferentes tipos celulares e os efeitos de fatores hormonais quando em contato com o material, assim como fornece interações com matriz extracelular, células da corrente sanguínea, proteínas e moléculas (BASU; NATH, 2009). Apresenta-se como grande desafio para a pesquisa, desenvolver metodologias *in vitro* que, cada vez mais possam produzir resultados equivalentes aos ensaios *in vivo*.

Esse esforço para se conseguir novas metodologias contemplam igualmente o fato da exposição de animais na rotina de testes para avaliação de toxicidade, situação que tem sido questionada por segmento cada vez mais crescente da sociedade. Fatores adicionais consistem na maior sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade e agilidade na obtenção de respostas que caracterizam os testes *in vitro*. Também tem sido contempladas aplicações em saúde pública, como novos métodos *in vitro* para detectar efeitos endócrinos (PIERSMA, 2004). Sendo assim, tem sido crescente o desenvolvimento de novos procedimentos visando atender tanto a preocupação ética (visando reduzir o número de animais utilizados) quanto alcançar informação toxicológica melhorada. No entanto, é criticamente importante determinar se tais métodos alternativos são válidos para uso em processos de avaliação de segurança, caso forneçam pelo menos um nível equivalente de proteção ao que é obtido com métodos já utilizados. Estudos de validação tem visado estimar a aplicabilidade destes testes, avaliando a confiabilidade e relevância de um método alternativo (BRUNER et al., 1998). A confiabilidade vem do estabelecimento da reprodutibilidade dos resultados obtidos de um método quando desenvolvido em diferentes laboratórios e a reprodutibilidade na comparação entre previsões do risco tóxico aplicando um modelo claramente estabelecido com aqueles obtidos empregando o método alternativo, para uma série de substâncias teste definidas. A relevância do método alternativo decorre do estabelecimento do significado científico e da utilidade dos resultados provenientes do mesmo, para um propósito particular (BRUNER et al., 1996).

Em função disso, ensaios utilizando culturas celulares para se obter informações sobre toxicidade de biomateriais tem sido alvo de crescente interesse desde a década de 50. Tais experimentos representam importante ferramenta para o entendimento dos eventos que ocorrem em células normais e cancerosas, diante da presença de

diferentes materiais. Assim, compreendendo as propriedades conjuntas da transformação e da imortalização de células em cultura, é possível que se obtenha um modelo para o estudo da formação de tumores em animais e no homem (VILELA et al., 2003; CANNAS; MASSE; PIGATTO, 1995).

A toxicidade *in vitro* traduz-se em efeito negativo ou deletério de um agente sobre as funções bioquímicas celulares normais, ou seja, uma perturbação na homeostase celular. Alguns exemplos de tais efeitos são a morte celular, redução da adesão celular, alteração na morfologia celular, redução na proliferação celular, redução na atividade biossintética (DOHERTY, 2009; KIRKPATRICK; MITTERMAYER, 1990). Desse modo, aceita-se geralmente que a citotoxicidade pode ser definida como “a avaliação *in vitro* de riscos toxicológicos usando a cultura celular”, realizando a avaliação de vários aspectos de função celular tais como a viabilidade e a proliferação celular, a perda de integridade da membrana, a redução da adesão celular, a atividade biossintética e a morfologia celular alterada (SILVA et al., 2005).

As metodologias disponíveis para ensaios da citotoxicidade foram descritas extensivamente por diversos pesquisadores (DEKKER, 1994; KIRKPATRICK et al., 1998; PIZZOFERRATO et al., 1994) e em diversas normas publicadas por entidades tais como a American Society for Testing and Materials (ASTM, 1983) e a International Standards Organization (ISO 10993-5, 2003). Dependendo das características estruturais e da aplicação final, o teste em materiais pode empregar métodos específicos avaliados.

2.6. Análise comparativa entre culturas celulares em monocamada e tridimensionais

Os testes *in vitro* que são indicados em compêndios e normas para realização de avaliação de biocompatibilidade acontecem em culturas celulares em monocamada (2D - bidimensional). A cultura celular bidimensional tem provado ser um método valioso para identificar rapidamente compostos tóxicos. O baixo custo e a alta velocidade de

execução dos testes tem feito a cultura celular 2D um componente chave também de programas de descoberta de fármacos (SUN et al., 2006).

No entanto, as limitações da cultura celular bidimensional tornaram-se cada vez mais reconhecidas. Cultivar células em placas e frascos e levá-las a crescerem e adotarem um fenótipo típico de seus pares homólogos *in vivo* é algo desafiador. Muitas descobertas relevantes foram possíveis por meio do estudo de função, diferenciação e proliferação celular *in vitro*. Embora culturas 2D sejam convenientes por razões práticas, como a possibilidade repetidamente de crescimento celular *in vitro*, elas impõem pressões mecânicas e geométricas não naturais em muitos tipos celulares. Nos tecidos, as células conectam-se umas às outras assim como à matriz extracelular. Essa matriz consiste de uma complexa rede fibrosa 3D com uma ampla distribuição de fibras e intervalos de conexões que fornece sinais físicos e bioquímicos. Complexos receptores na superfície das células facilitam interações entre as células vizinhas, com a matriz extracelular e com outros fatores exógenos, capacitando as células a identificarem os diversos sinais físicos e bioquímicos do seu ambiente. Dada esta complexa interação bioquímica e mecânica, propriedades biológicas importantes podem ser perdidas quando as células são estudadas em um sistema de cultura celular bidimensional (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; BOKHARI et al., 2007). Estudos têm demonstrado que a matriz extracelular não é somente uma estrutura de suporte que dá ao tecido suas propriedades mecânicas e ajuda a organizar a comunicação entre células imersas na matriz, mas também contem informação que ajuda a organizar as células (SUN et al., 2006).

Células isoladas diretamente de organismos alteram, com elevada frequência, padrões de expressão gênica e metabolismo em cultura 2D e sofrem mudanças morfológicas, que não ocorreriam *in vivo*. Diversos estudos têm demonstrado algumas diferenças observadas entre cultivo de células em ambiente bi e tridimensionais, tais como: fibroblastos humanos cultivados em matrizes 3D derivadas de tecido formam estruturas com integrina específica chamadas “adesões de matriz 3-D” e possuem maiores taxas de proliferação que células cultivadas em 2D (CUKIERMAN et al., 2001); cultura celular de pele em 3D resulta em uma morfologia mais relevante fisiologicamente tanto de fibroblastos como de queratinócitos (incluindo diferenciação)

comparado com culturas 2D em monocamada (SUN et al., 2006; WITTE; KAO, 2005); cultura celular de carcinoma hepático humano (HepG2) cultivadas em ambiente tridimensional mantiveram sua integridade estrutural, apresentaram maior viabilidade, foram menos suscetíveis a morte celular nos níveis maiores de citotoxina comparado com culturas em monocamada e apresentaram resposta ao fármaco de um modo mais comparável à atividade conhecida *in vivo* (BOKHARI et al., 2007); doxorubicina diminuiu propriedades de migração de células de fibrosarcoma humano (HT1080) em 70% na cultura bidimensional convencional, enquanto este efeito foi completamente abolido na cultura 3D (MILLEROT-SERRUROT et al., 2010); na aplicação com testes com nanopartículas metálicas, foi verificado que os efeitos tóxicos da nanopartícula foram significativamente reduzidos na cultura esferóide quando comparado aos resultados da cultura 2D, além de terem apresentado melhor correlação com os resultados obtidos nos testes *in vivo* (LEE et al., 2009).

As matrizes de cultura celular tridimensionais, também conhecidas como *scaffolds*, foram então introduzidas para superar as limitações da cultura 2D. Essas matrizes são substratos porosos que podem suportar o crescimento, a organização e a diferenciação celular sobre ou em sua estrutura. A diversidade de materiais e de arquiteturas é muito maior em matrizes 3D do que em substratos 2D. Essa variedade de biomatrizes é devida a ampla faixa de tecidos sendo modelados e a necessidade de produzir suportes celulares com diferentes características físicas e mecânicas, porosidade, permeabilidade e morfologia de superfície em nanoescala (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008).

2.7. Avaliação da toxicidade *in vitro* de nanopartículas

Com a contínua comercialização de produtos nanotecnológicos, a exposição humana a nanopartículas aumentará consideravelmente e uma avaliação de sua potencial toxicidade é essencial. Sua grande área de superfície por unidade de massa pode conduzir a uma reatividade biológica aumentada que eleva qualquer toxicidade

intrínseca. Sendo assim, o *screening* de técnicas normalmente utilizadas para testes de toxicidade de substâncias de macro-escala podem não ser apropriadas para caracterização do risco de nanopartículas. Porém, estas podem ser adaptadas ou modificadas considerando as propriedades nanoespecíficas (KROLL et al., 2009).

Estudos de citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas usando diferentes linhagens celulares, tempos de incubação e testes colorimétricos estão cada vez mais sendo publicados. Entretanto, estes estudos incluem uma ampla faixa de concentrações de nanopartículas e tempos de exposição, tornando difícil determinar se a citotoxicidade observada é relevante fisiologicamente. Adicionalmente, grupos diferentes escolhem usar várias linhagens celulares assim como condições de cultura variáveis, o que torna difícil a comparação direta entre os estudos disponíveis (LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008).

Para se determinar um estudo de avaliação da toxicidade *in vitro* de nanopartículas, é importante considerar as limitações dos métodos usados atualmente, assim como observar as propriedades das nanopartículas que provavelmente interferem com sistemas de testes *in vitro* (JONES; GRAINGER, 2009; KROLL et al., 2009). Testes que avaliam a viabilidade celular na forma de perda da integridade da membrana, perda da atividade metabólica, perda da adesão em monocamadas e análise do ciclo celular podem ser de muita importância para identificar a suscetibilidade da linhagem celular, a toxicidade da nanopartícula, e potencialmente dar indícios quanto ao tipo de efeito (citostático/citotóxico) e local do dano celular (MURTHY; PATHAK, 2009). Sendo assim, muitos são os desafios que permanecem para se alcançar metodologias que possam agregar segurança na utilização de produtos em escala nanométrica, principalmente no âmbito biomédico.

3. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- obtenção, esterilização e caracterização de nanopartículas poliméricas, em particular, de polibutílcianoacrilato;
- desenvolvimento de culturas celulares em estrutura tridimensional, visando simular sistemas de avaliação quanto à biocompatibilidade in vitro de materiais poliméricos, especificamente de nanopartículas poliméricas de polibutílcianoacrilato;
- comparação dos resultados obtidos dos testes com culturas tridimensionais aos testes de citotoxicidade em monocamadas celulares.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Nanopartículas de polibutilcianoacrilato e de poli- ϵ -caprolactona

Para a síntese de nanopartículas de polibutilcianoacrilato fez-se uso do adesivo de tecido Histoacryl®, que é constituído pelo monômero n-butil-2-cianoacrilato (enbucrilato). Como agente estabilizante foi utilizado dextran 70000. Histoacryl® e dextran 70000 foram adquiridos por Sichel Werk, Hannover e Sigma Chemical Company St Louis, respectivamente. Para a síntese de nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona foi utilizado o polímero poli- ϵ -caprolactona obtido de Sigma Aldrich. Os tensoativos monoestearato de sorbitano (Span 60) e polissorbato 80 (Tween 80) foram adquiridos por Sigma Aldrich e Synth, respectivamente. O óleo composto de triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (Miglyol®) e acetona utilizados foram adquiridos da Química Anastácio e Synth, respectivamente. Os materiais foram utilizados conforme como recebidos. Foram utilizados ácidos e bases grau analítico.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção, caracterização e esterilização das nanopartículas

4.2.1.1. Obtenção das nanopartículas

4.2.1.1.1. Polibutilcianoacrilato

As nanopartículas de polibutilcianoacrilato foram preparadas de acordo com o método de polimerização por emulsão descrito em trabalhos já publicados (COUVREUR *et al.*, 1979; COUVREUR; ROLAND; SPEISER, 1982; VAUTHIER *et al.*, 2003a). O monômero (1%) foi disperso gota a gota em solução ácida (HCl 0,1 M, pH 2,5), contendo 1% do agente estabilizante (dextran 70000). A polimerização ocorreu sob agitação magnética (800 rpm) durante 4 horas. Ao término do tempo estipulado para polimerização, foi adicionada solução de NaOH 0,1M em quantidade suficiente para neutralização da suspensão (pH 7,0). Em seguida, filtrou-se o monômero não polimerizado em papel de filtro sobre funil de vidro.

Para a determinação da massa de nanopartícula formada, a amostra foi submetida a liofilização (liofilizador L101, Liotop). Após registro da massa obtida, a massa foi ressuspensa em água ultrapura (MilliQ) para preparo das soluções de diferentes concentrações a serem aplicadas na cultura celular. Em um primeiro momento, a liofilização foi feita com a amostra completa. Em um segundo momento, a liofilização foi feita apenas com uma alíquota, considerando-se esta forma como a ideal para a determinação da massa de nanopartícula formada.

4.2.1.1.2. Poli- ϵ -caprolactona

As nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona foram preparadas de acordo com o método de polimerização interfacial descrito em trabalhos já publicados (FESSI *et al.*, 1989, SINHA *et al.*, 2004). Primeiramente, o monômero (1%) foi dissolvido em acetona, juntamente com o monoestearato de sorbitan (Span 60) e o Miglyol® (triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico), sendo toda essa fase oleosa submetida a aquecimento e agitação para favorecer a solubilização. O polissorbato 80 (Tween 80) foi dissolvido em água destilada e essa fase aquosa também foi submetida a aquecimento e agitação. Em seguida, adicionou-se a fase oleosa sobre a fase aquosa,

lentamente na forma de um fino jato. Imediatamente, a fase aquosa foi se tornando uma solução leitosa, dando a indicação da formação das nanopartículas. A suspensão coloidal permaneceu sob agitação durante 1 hora. Para redução do volume e retirada da acetona, a suspensão foi submetida a fluxo de nitrogênio. Foi retirada uma alíquota destinada à análise no Zetasizer para verificação das características da nanopartícula e em seguida, a amostra já com o volume reduzido e sem a acetona foi liofilizada.

4.2.1.2. Esterilização das nanopartículas

Para conferir o atributo esterilidade à amostra a ser submetida aos ensaios de cultura celular, a amostra foi submetida a dois diferentes métodos de esterilização.

Uma alíquota das nanopartículas de polibutílcianoacrilato foi retirada e submetida a autoclavação durante 5 minutos a 121°C. Em seguida, uma alíquota de 500 µL foi retirada e adicionada em 90mL de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) e incubada a 30-35 °C por 14 dias. Diariamente, o recipiente foi avaliado quanto à presença de crescimento microbiano.

Com outro lote de preparo de nanopartícula de polibutílcianoacrilato, a amostra foi liofilizada e depois de ressuspendida em água MilliQ estéril, foi submetida à exposição da radiação UVC (ultravioleta C) durante 15 minutos e 30 minutos, sob fluxo laminar, em agitador de plataforma. Após os dois tempos de exposição, foram retiradas alíquotas para análise no Zetasizer e Coulter para verificação das características da nanopartícula.

A amostra liofilizada das nanopartículas de poli-ε-caprolactona depois de ressuspendida em água ultrapura (MilliQ) estéril, foi submetida a exposição da luz UV durante 15 minutos, sob fluxo laminar, em agitador de plataforma. Em seguida, uma alíquota de 500 µL foi retirada desta suspensão e transferida para 90 mL de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) e incubada a 30-35 °C por 14 dias. Diariamente, o recipiente foi avaliado quanto à presença de crescimento microbiano.

4.2.1.3. Caracterização das nanopartículas

Nanopartículas podem ser caracterizadas, dentre diversas técnicas, ao se realizar a avaliação do seu tamanho, do índice de polidispersão, do potencial zeta e por meio de sua visualização ao microscópio eletrônico.

O índice de polidispersão avalia a distribuição de tamanho das partículas. De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, resultado da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. É possível determinar o potencial zeta utilizando-se técnicas de eletroforese (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Alíquotas da amostra autoclavada e aquela submetida à exposição da radiação UVC foram retiradas para caracterização quanto ao tamanho, ao índice de polidispersão e ao potencial zeta, a ser avaliada em aparelho Zetasizer (Malvern Instruments) e no Coulter (N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer – Beckman Coulter).

Foi feita a visualização da amostra liofilizada das nanopartículas de polibutílicoacrilato no Microscópio Eletrônico de Varredura Nova NanoSem 400 (FEI), assim como da amostra líquida seca a temperatura ambiente. Neste caso, uma gota foi colocada em lâmina de vidro, aguardando-se sua secagem. Em seguida, foi realizado o depósito de ouro sob a lâmina com a amostra para visualização ao microscópio.

4.2.2. Cultura Celular

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Patologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, local equipado para a manipulação e

armazenamento de culturas celulares. Todo o trabalho foi desenvolvido empregando material estéril e técnicas assépticas.

Para a cultura em monocamada e em ambiente tridimensional, as células utilizadas foram linhagens celulares de fibroblastos e de melanócito de prepúcio humano isolados de cultura primária (FP#2 e FM305, respectivamente) e células de melanoma humano (linhagem SK-Mel-103 (#9)), fornecidas pelo Banco de Células do Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2.2.1. Cultura em monocamada

O meio de cultura celular empregado nas culturas celulares de fibroblasto e melanoma foi constituído de meio Eagle modificado Dulbecco (DMEM) (GIBCO/Invitrogen Corporation) com suplemento de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen), 25 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich) e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO/Invitrogen Corporation). As células foram cultivadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro (P100), e mantidas em estufa (Thermo Forma) a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂ até que alcançassem a população desejada. Para desagregação da monocamada celular, as placas foram previamente lavadas com solução salina fosfato (PBS - pH 7,2) com o objetivo de retirar o restante do meio de cultura e em seguida, foi utilizada a solução de 0,1% de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). No caso da manutenção da cultura celular de melanócitos, o meio de cultura utilizado foi o meio 254CF (Cascade Biologics), com uso de suplemento HMGS 100x (*Human Melanocyte Growth Supplement* 100x – Cascade Biologics), a adição de 0,2M de cloreto de cálcio (Cascade Biologics) e de 25 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich) e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO/Invitrogen Corporation).

Após o procedimento de manutenção das linhagens celulares de fibroblastos e de melanócitos, com as células em suspensão, foi realizada a contagem das células por meio da Câmara de Neubauer. Nas placas de 96-well, foram semeadas 5x10³ células

de cada tipo celular em volumes de 200 μL por poço, em quadruplicata para cada condição a ser testada. Foram utilizadas 3 placas de 96-*well*, correspondendo ao teste de 24, 48 e 72 horas de contato com a nanopartícula. Nas placas de 24-*well*, foram semeadas 2×10^4 células em volumes de 1 mL por poço, em triplicata para cada condição a ser testada. Foram utilizadas 3 placas de 24-*well*, correspondendo ao teste de 24, 48 e 72 horas de contato com a nanopartícula. Após serem semeadas, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO_2 .

No cultivo e manutenção da linhagem celular de melanoma, o procedimento realizado foi o mesmo aplicado aos fibroblastos, no entanto, com diferença no número de células plaqueadas. Nas placas de 96-*well*, foram semeadas 3×10^3 células em volumes de 200 μL por poço e nas placas de 24-*well*, foram semeadas 10^4 células em volumes de 1 mL por poço.

4.2.2.2. Cultura tridimensional: Equivalente dérmico

Após o procedimento de manutenção da linhagem celular de fibroblastos, foi realizada a contagem das células por meio da Câmara de Neubauer. Com base na concentração obtida pela contagem, foi feito o cálculo para a obtenção da quantidade de células necessária para o ensaio, plaqueando-se 10^5 células por poço da placa de 24-*well*, em duplicata para cada condição de estudo. Foram utilizadas 3 placas de 24-*well*, correspondendo ao teste de 24, 48 e 72 horas de contato com a nanopartícula.

O volume da suspensão de células correspondente à quantidade de células desejada foi submetido à centrifugação, na rotação de 2000 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com soro fetal bovino, numa proporção de 50 μL de SFB em 1 mL da solução de colágeno. O tubo contendo as células foi colocado em banho de gelo, enquanto preparava-se a solução de colágeno.

A solução de colágeno foi preparada considerando que em 1 mL da solução de colágeno, 750 μL era de colágeno tipo I de cauda de rato (BD Biosciences), 100 μL de

tampão de reconstituição 10 vezes (2,2% de NaHCO_3 (Merck); 0,05 M de NaOH (Merck); 200 mM de HEPES (Sigma)), 100 μL de meio HAM-F12 10 vezes (Invitrogen, GIBCO) e 50 μL de SFB com as células. O SFB com as células foi adicionado por último ao tubo contendo os outros componentes da solução de colágeno, realizando suave homogeneização, e colocando o tubo em banho de gelo.

A cada poço da placa de 24-well, foram adicionados 300 μL da solução de colágeno, realizando o devido espalhamento na placa, cobrindo toda a superfície do poço. Após aguardar o tempo necessário para a polimerização do colágeno, adicionou-se 1 mL de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino. Após serem semeadas, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO_2 .

4.2.2.3. Cultura tridimensional de células de melanoma

Após o procedimento de manutenção das células (melanoma), foi realizada a contagem das células por meio da Câmara de Neubauer. Com base na concentração obtida pela contagem, foi feito o cálculo para a obtenção da quantidade de células necessária para o ensaio, plaqueando-se 10^5 células por poço da placa de 24-well, em duplicata para cada condição de estudo. Foram utilizadas 3 placas de 24-well, correspondendo ao teste de 24, 48 e 72 horas de contato com a nanopartícula.

O procedimento para realização dos testes com melanoma foi feito de forma a aguardar a penetração das células de melanoma na matriz de colágeno. Assim, a solução de colágeno foi preparada sem a adição de fibroblasto, obedecendo à seguinte proporção: para 1 mL da solução de colágeno, 750 μL era de colágeno tipo I, 100 μL de tampão de reconstituição 10 vezes, 100 μL de meio HAM-F12 10X e 50 μL de SFB.

A cada poço da placa de 24-well, foram adicionados 1 mL da solução de colágeno, realizando o devido espalhamento de forma a revestir toda a superfície do poço. Após aguardar o tempo necessário para a polimerização do colágeno, adicionou-se 1 mL do meio de cultura com a quantidade de células desejada por poço. Após

serem semeadas, as células foram incubadas por 5 dias em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 dias.

4.2.2.4. Cultura tridimensional: Melanoma sobre equivalente dérmico

O procedimento realizado para obtenção do melanoma sobre o equivalente dérmico foi o mesmo procedimento para a obtenção do equivalente dérmico. No entanto, após aguardar o tempo para polimerização do colágeno, adicionou-se 1 mL do meio de cultura com a quantidade de células de melanoma desejada por poço, que neste caso foi de 5×10^4 células. Após serem semeadas, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.3. Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por testes de viabilidade e metabolismo celular com uso de corantes. Para o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolina) (Sigma Aldrich), foram utilizadas placas de 96-*well* e DMSO (dimetilsulfóxido) (Merck) para a solubilização dos cristais formados. Para o teste de Azul de Tripán (Mikroskopie, Merck) foram utilizadas placas de 24-*well*.

4.2.3.1. Teste de avaliação do metabolismo celular com MTT

Após a realização do procedimento de plaqueamento e incubação com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionadas as amostras nas seguintes condições:

Para o teste MTT (200 μ L/poço): Controle (meio de cultura – DMEM+10% SFB); solução com o diluente da suspensão de nanopartículas, ou seja, água ultrapura (MilliQ); suspensões da nanopartícula nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 μ g/mL para fibroblastos, 1, 10, 25, 50, 75 e 100 μ g/mL for melanócitos e 1, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 μ g/mL para células de melanoma. Para cada condição, foram utilizados 4 poços.

Após adição das amostras, as células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, e após 24 horas foi feito o procedimento para a avaliação da viabilidade celular. O mesmo procedimento foi realizado após 48 e 72 horas.

Para as nanopartículas de polibutílcianoacrilato, a avaliação da viabilidade celular foi repetida ao longo de 3 semanas.

Após o tempo de exposição correspondente, foram então, adicionados 20 μ L de solução de MTT (5 mg/mL preparada com PBS). A placa de 96-well foi novamente colocada na estufa e incubada por 4 horas. Em seguida, o meio contendo MTT foi aspirado de cada poço e foram adicionados a todos eles 200 μ L de DMSO para solubilizar os cristais formados. A placa foi agitada por 2 minutos e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplaca (Synergy HT, Biotek), usando o software Gen 5 Data Analysis. A avaliação do metabolismo celular foi expressa como um percentual do valor da cultura controle.

Antes das leituras das placas, as células foram avaliadas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon) e foram tiradas as fotos dos poços, para avaliação e registro do perfil celular.

4.2.3.2. Teste de viabilidade com Azul de Tripán - células em monocamada

Após a realização do procedimento de plaqueamento e incubação com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionadas as amostras nas seguintes condições:

Para o teste Azul de Tripán (1 mL/poço): Controle (meio de cultura – DMEM+10% SFB); suspensões de nanopartículas nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL para fibroblastos, 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL para melanócitos e 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL para células de melanoma. Para cada condição, foram utilizados 3 poços.

Após adição das amostras, as células foram novamente incubadas em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂, e após 24 horas foi feito o procedimento para a avaliação da viabilidade celular. O mesmo foi realizado após 48 e 72 horas.

Para as nanopartículas de polibutílcianoacrilato, a avaliação da viabilidade celular foi repetida ao longo de 3 semanas.

Após o tempo de exposição correspondente, iniciou-se o procedimento para retirada das células. *Eppendorfs* de 2,0 mL foram identificados, um para cada poço. Os sobrenadantes foram retirados dos poços e colocados individualmente no respectivo *eppendorf*. Da mesma forma, com os 200 µL de PBS utilizados para lavagem das células. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL de tripsina, permanecendo até que as células estivessem desprendidas da placa. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de meio de cultura (DMEM+10% SFB) para inativação da tripsina e toda a solução presente em cada poço foi transferida para o *eppendorf* correspondente. Foram adicionados 200 µL de PBS a cada poço, para retirada de qualquer célula restante e em seguida, estes volumes foram transferidos para *eppendorfs*. As suspensões das células nos *eppendorfs* foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado e ao *pallet* foram adicionados 30 µL de meio de cultura (DMEM+10% SFB) seguidos por 30 µL de solução de Azul de Tripán (0,8 mM preparada com PBS). Após homogeneização, foram retiradas duas alíquotas de 10 µL e adicionadas na câmara de Neubauer para contagem, uma de cada lado da câmara. Foi realizada a contagem, diferenciando células coradas (não-viáveis) das não-coradas (viáveis). A viabilidade celular foi expressa em percentual de células viáveis em relação às células totais (viáveis e não-viáveis).

Antes das leituras das placas, as células foram avaliadas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon) e documentou-se com fotomicrografias os diferentes poços, para avaliação e registro do perfil celular.

4.2.3.3. Teste de viabilidade celular com Azul de Tripán – células em estrutura tridimensional

Após a realização do procedimento de plaqueamento e incubação com a estrutura tridimensional de células já formada, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionadas as amostras, conforme a seguir descrito:

Para o teste Azul de Tripán (1 mL/poço): Controle (meio de cultura – DMEM+10% SFB); suspensões da nanopartícula nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL. Para cada condição, foram utilizados 2 poços.

Após adição das amostras, as células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, e após 24 horas foi feito o procedimento para a avaliação da viabilidade celular. O mesmo foi realizado após 48 e 72 horas. Aplicou-se o mesmo para as três situações estudadas: equivalente dérmico, melanoma sobre colágeno e melanoma sobre equivalente dérmico.

Para as nanopartículas de polibutílicoacrilato, a avaliação da viabilidade celular foi repetida ao longo de 3 semanas.

Após o tempo de exposição correspondente, iniciou-se o procedimento para retirada das células. Tubos falcon para 15 mL foram identificados, um para cada poço. Os sobrenadantes foram retirados dos poços e colocados individualmente no respectivo tubo. Da mesma forma procedeu-se com os 200 µL de PBS utilizados para lavagem das células. Em seguida, foram adicionados a cada poço 300 µL de tripsina, aguardando até que as células estivessem desprendidas da placa. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante, o qual foi adicionado ao respectivo tubo. Em seguida, foram adicionados 600 µL de collagenase (apenas para equivalente dérmico) ou 1 mL de collagenase (no caso do melanoma sobre colágeno), aguardando-se tempo necessário para degradação do colágeno. Todo o volume contido no poço foi adicionado ao respectivo tubo, seguido pela adição de 1 mL de meio de cultura (DMEM+10% SFB) em cada tubo. Foram adicionados 200 µL de PBS a cada poço, para retirada de qualquer célula restante e em seguida, todo o conteúdo do poço foi transferido para o tubo. As suspensões das células nos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm.

O sobrenadante foi retirado e ao *pallet* foram adicionados 30 μ L de meio de cultura (DMEM+10% SFB) seguidos por 30 μ L de solução de Azul de Tripan (0,8 mM preparada com PBS). Após homogeneização, foram retiradas duas alíquotas de 10 μ L e adicionadas na câmara de Neubauer para contagem, uma de cada lado da câmara. Foi realizada a contagem, diferenciando células coradas (não-viáveis) das não-coradas (viáveis). A viabilidade celular foi expressa em percentual de células viáveis em relação às totais (viáveis e não-viáveis).

Antes das leituras das placas, as células foram avaliadas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon) e documentou-se com fotomicrografia os diferentes poços, para avaliação e registro do perfil celular, embora a presença da matriz de colágeno tenha dificultado a visualização.

4.2.4. Testes para avaliação do tipo de morte celular

Para o teste para avaliação do tipo de morte (apoptose/necrose) pela externalização de fosfatidilserina (FS), foram utilizadas placas de 6-well, cisplatina (Sigma Aldrich), como controle de apoptose, DMSO (Merck), como controle de necrose. Como marcador de apoptose, utilizou-se Anexina-V conjugada com fluoresceína (Anexina V-FITC; Proteimax) ou com aloficocianina (Anexina V-APC; Invitrogen) e como marcador de necrose utilizou-se iodeto de propídio (PI; Invitrogen). Foi utilizado durante o procedimento de lavagem do *pallet*, assim como para ressuspendê-lo para passagem no citômetro de fluxo, o tampão de ligação estéril composto de 10 mM HEPES (Sigma), 150 mM NaCl (Sigma), 5 mM KCl (Merck), 1 mM $MgCl_2$ (Merck) e 1,8 mM $CaCl_2$ (Merck) (pH=7,4).

Para o teste para avaliação de autofagia por meio da quantificação de vacúolos autofágicos, foram utilizadas placas de 6-well, rapamicina (Sigma), como indutor de autofagia e como inibidor, foi utilizado bafilomicina (Sigma). Como marcador para visualização do processo autofágico foi utilizado alaranjado de acridina (*acridine orange* – AO; Sigma).

4.2.4.1. FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) para identificação do tipo de morte celular

Após o procedimento de manutenção das linhagens celulares de fibroblasto e melanoma, foi realizada a contagem das células por meio da Câmara de Neubauer. Com base na concentração obtida pela contagem, foi feito o cálculo para a obtenção da quantidade de células necessária para o ensaio. No caso da avaliação em monocamada, nas placas de 6-*well*, foram semeadas 15×10^4 células, no caso do fibroblasto, e 9×10^4 células, no caso do melanoma em volumes de 3 mL por poço. Após serem semeadas, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂. Para avaliação da cultura tridimensional, no caso do equivalente dérmico, nas placas de 6-*well* foram semeadas 50×10^4 células em volumes de 900 µL de solução de colágeno por poço, seguidos pela adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM+10% SFB). No caso da cultura tridimensional das células de melanoma, nas placas de 24-*well* foram semeadas 10^5 células em volumes de 1 mL de solução de colágeno por poço, seguidos pela adição de 1 mL de meio de cultura (DMEM+10% SFB).

Após 24 horas de incubação (no caso do equivalente dérmico e 5 dias para o melanoma cultivado em ambiente tridimensional), foram adicionados reagentes nas seguintes condições:

- Controle Não Tratado: adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM+10% SFB);
- Controle positivo de apoptose: adição de 3 mL de solução de cisplatina 100 µM (no caso do fibroblasto) e 70 µM (no caso do melanoma);
- Controle positivo de necrose: adição de 3 mL de solução de DMSO 5% (no caso do fibroblasto) e 7% (no caso do melanoma);
- Tratado: adição de 3 mL de solução de nanopartículas de polibutilcianoacrilato na concentração do IC₅₀ e próximas ao IC₅₀ encontrado nos testes de Azul de Tripán (24h), para cada tipo celular.

Foram utilizados 4 poços para cada condição. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂.

Após o tempo decorrido, efetuou-se o procedimento para retirada das células. Tubos falcon de 15 mL foram identificados, um para cada poço. O sobrenadante foi retirado e colocado cada um no respectivo tubo. Da mesma forma, com os diferentes volumes de 1 mL de PBS utilizados para lavagem das células. Em seguida, foram adicionados a cada poço 1 mL de tripsina, aguardando até que as células estivessem desprendidas da placa. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de meio de cultura (DMEM+10% SFB) para inativação da tripsina e toda a solução presente no poço foi transferida para o tubo correspondente. Foram adicionados 1 mL de PBS a cada poço, para retirada de qualquer célula restante e em seguida, todo o conteúdo do poço foi transferido para o falcon. As soluções das células nos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e a cada tubo foi adicionado 1 mL de PBS para lavagem do *pallet*. Novamente, as soluções das células nos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado volume de 500 µL de tampão de ligação para lavagem do *pallet*. Novamente, as soluções das células nos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm, com posterior descarte do sobrenadante.

Em um tubo representativo de cada uma das condições foi adicionado 540 µL de tampão de ligação para ressuspender o *pallet*, e todo o conteúdo foi transferido para tubos de análise no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD, Becton Dickinson).

Em outros dois tubos de cada condição, foi utilizado 100 µL de solução de anexina V-FITC em tampão de ligação na diluição 1:500 para ressuspender as células (ou 2 µL de anexina V-APC às células ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação para as análises em ambiente tridimensional) e após transferência para os tubos, foram incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após o tempo decorrido, em um dos tubos representativos de cada condição, adicionou-se 440 µL de tampão de ligação e ao outro tubo de cada condição adicionou-se 40 µL da solução de iodeto de propídio em tampão de ligação (100 µg/mL) e posteriormente acrescentou-se 400 µL de tampão de ligação.

Aos últimos tubos de cada condição, adicionou-se 40 μ L da solução de iodeto de propídio em tampão de ligação (100 μ g/mL) e posteriormente acrescentou-se 500 μ L de tampão de ligação.

Na sequência, as células foram avaliadas no citômetro de fluxo usando o software FlowJo. A fluorescência da anexina V-FITC foi medida na fluorescência verde (530/30 nm) e iodeto de propídeo na fluorescência vermelho-laranja (585/42 nm). 10000 eventos foram analisados por experimento e o teste foi realizado em triplicata.

4.2.4.2. Quantificação de vacúolos autofágicos por citometria de fluxo

Após o plaqueamento realizado semelhantemente ao que foi descrito no teste FACS, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Decorridas 24 horas de incubação (no caso do equivalente dérmico) e 5 dias (para o melanoma cultivado em ambiente tridimensional), foram adicionados reagentes nas seguintes condições:

- Controle Não Tratado: adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM+10% SFB);
- Controle inibidor de autofagia: adição de 3 mL de solução de bafilomicina 10 nM;
- Controle indutor de autofagia: adição de 3 mL de solução de rapamicina 200 nM. Neste caso, a solução foi adicionada 1 hora antes da coleta;
- Tratado: adição de 3 mL de solução de nanopartículas de polibutílicoacrilato na concentração do IC₅₀ (ou próximo ao valor) encontrado nos testes de Azul de Tripán (24h), para cada tipo celular e outras concentrações menores que o IC₅₀.

Após o tempo decorrido, foram adicionados 6 μ L da solução de alaranjado de acridina (500 μ g/mL) a cada poço, e as células foram novamente incubadas em estufa durante 15 minutos. Em seguida, foi realizada a coleta das células conforme descrito no ensaio anterior. As soluções das células nos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm.

O sobrenadante foi descartado e a cada tubo foi adicionado 1 mL de PBS para lavagem do *pallet*. Novamente, as suspensões das células em cada um dos tubos foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 500 µL de PBS para ressuspender as células e transferi-las ao tubo para análise no citômetro de fluxo.

4.2.5. Ensaio clonogênico

Para o ensaio clonogênico, foram utilizadas placas P60 (60 mm), cristal violeta (Fisher) e solução de glutaraldeído 25% (Sigma Aldrich) na solução corante das células.

Após o procedimento de manutenção das linhagens celulares de fibroblasto e de melanoma, foi realizada a contagem das células por meio da Câmara de Neubauer. Com base na concentração obtida pela contagem, foi feito o cálculo para a obtenção da quantidade de células necessária para o ensaio. Nas placas de P60, foram semeadas 600 células, tanto fibroblastos como melanomas, em volumes de 4 mL por placa. Após serem semeadas, as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂.

Após o tempo decorrido, as células foram tratadas com diferentes concentrações da nanopartícula de polibutílicoacrilato. Para os dois tipos celulares, as condições testadas foram: Não Tratado; 10 (para melanoma), 25 e 50 µg/mL.

Posteriormente ao tratamento, as células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, durante 7 e 14 dias. No caso das placas destinadas a 14 dias de incubação, no 7º dia, foi feito novo tratamento nas condições descritas acima.

Após o tempo de incubação correspondente, foi retirado o sobrenadante das placas, seguindo-se lavagem com 3 mL de PBS. Novamente, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 3 mL da solução de cristal violeta (0,5% de cristal violeta numa solução de glutaraldeído 6%) a cada placa, deixando em contato durante 3 horas. Após o tempo indicado, descartou-se o corante, lavando-se as placas com água, até completa retirada do corante.

5. Resultados e Discussão

5.1. Síntese das nanopartículas

5.1.1. Polibutilcianoacrilato

A caracterização da nanopartícula de polibutilcianoacrilato foi feita utilizando os aparelhos Zetasizer e Coulter. As medidas de tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos valores obtidos quanto ao tamanho médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de polibutilcianoacrilato, sendo amostra original (conforme obtida sem ser submetida a qualquer processo de esterilização); amostra autoclavada; amostras submetidas a luz ultravioleta por 15 e 30 minutos.

Amostra	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
Original	170,7	0,239	-4,28
Autoclavada	222,3	0,557	NC
15min UV	202,9	0,307	-5,18
30min UV	279,1	0,356	-2,01

Obs.: NC: não calculado

Os resultados referentes ao tamanho médio das nanopartículas de polibutilcianoacrilato que não sofreram qualquer processo de esterilização, assim como as que foram expostas durante 15 minutos à luz ultravioleta apresentaram-se semelhantes aos valores de tamanho médio de materiais em condições correspondentes obtidos por diversos autores (FERNANDEZ-URRUSUNO *et al.*, 1995; VAUTHIER *et al.* 2003a; BRZOSKA *et al.* 2004; MAKSIMENKO *et al.*, 2008). Considerando a amostra que foi submetida a autoclavação, ao visualizar o frasco contendo a amostra com a nanopartícula, a suspensão que antes era homogeneamente leitosa, após a autoclavação possuía partículas em suspensão, visíveis a olho nu, que

se depositavam ao fundo do recipiente. Mesmo em se tratando de um curto período de exposição, a elevada temperatura e pressão podem ter levado à aglomeração das nanopartículas, fazendo com que aumentassem de tamanho, sedimentando-se, numa perda irreversível de sua estabilidade (SOMMERFELD; SCHROEDER; SABEL, 1998). De forma semelhante comportou-se a amostra que foi exposta à luz ultravioleta por 30 minutos, evidenciando que o tempo de exposição à luz ultravioleta também foi fator determinante para a alteração do tamanho médio das nanopartículas. A escolha do método de esterilização das nanopartículas é uma etapa importante, pois se deseja garantir a ausência de contaminação das células e também que as características da nanopartícula não sejam alteradas durante o processamento. Como as nanopartículas de polibutílicoacrilato são sensíveis ao calor e o uso de filtração esterilizante também não é aplicável, uma vez que o tamanho médio da partícula (geralmente entre 150-300 nm) é similar ao tamanho do poro dos filtros (220 nm), buscou-se a tentativa com a irradiação, com pequeno tempo de exposição.

Outro fator a ser considerado como potencial causa do aumento no tamanho médio das nanopartículas é que antes de serem esterilizadas, estas foram submetidas ao processo de liofilização como mecanismo intermediário visando quantificar as nanopartículas. O congelamento que se faz necessário para a liofilização pode levar ao agrupamento das nanopartículas, que muitas vezes, se mantém após a dispersão da nanopartícula liofilizada e induz à sua instabilidade e ao aumento de tamanho ainda maior ao longo do tempo, podendo consequentemente, ocorrer a sua sedimentação. Isso se deve ao fato da cristalização da água durante o congelamento inserir uma tensão mecânica que leva a desestabilização (ABDELWAHED *et al.*, 2006; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Sendo assim, surge como alternativa para se prevenir o agrupamento de nanopartículas que necessitem passar pelo processo de liofilização, a utilização de crioprotetores. Os mais comuns citados na literatura são os carboidratos (glicose, sacarose, manitol, frutose), sendo os mono e dissacarídeos os mais efetivos na manutenção das características iniciais de tamanho das partículas. Esse efeito crioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as ressuspensíveis (SCHAFFAZICK *et*

al., 2003). É importante também o cuidado de se utilizar, para ressuspender a nanopartícula liofilizada, uma solução que mantenha o seu pH ideal assim como armazená-la em temperatura adequada (4°C) (SOMMERFELD; SABEL; SCHROEDER, 2000).

O potencial zeta de todas as amostras não foi consideravelmente negativo. Uma característica vantajosa para a estabilidade de uma nanopartícula é que ela possua um valor de potencial zeta relativamente alto, em módulo. Devido à repulsão eletrostática gerada, esta permite o afastamento entre as partículas, diminuindo a probabilidade que elas se agrupem em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes e assim, aumentem de tamanho (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Portanto, o fato do potencial zeta não ter sido consideravelmente negativo também pode ser um fator que possibilite o agrupamento das nanopartículas diante de um processo externo, como a liofilização, a autoclavação ou a radiação ultravioleta.

Quanto ao índice de polidispersão, sendo este um número elevado, é uma característica indesejável, pois diante do processo de preparo da nanopartícula, foram formadas nanopartículas de tamanhos diversos. No estudo realizado, o índice de polidispersão foi adequado para a amostra sem alterações e para aquela submetida a 15 minutos de luz ultravioleta (até 0,3 considerado aceitável). Já para as demais amostras, o índice de polidispersão foi elevado (> 0,3), indicando a perda da homogeneidade diante dos processos considerados.

Quanto à esterilidade das amostras, tanto a autoclavação quanto a exposição à luz ultravioleta levaram à esterilidade da amostra. Não houve crescimento microbiano no decorrer de até 14 dias de incubação.

A Figura 2 ilustra as nanopartículas de polibutílcianoacrilato visualizadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura. Na foto A, está a amostra liofilizada e é possível observar a estrutura esférica das nanopartículas, as quais, provavelmente em função do processo de congelamento e posterior liofilização sem a adição de crioprotetores, apresentou tamanhos variáveis e grandes aglomerados. Na foto B, feita com a amostra líquida que foi seca à temperatura ambiente e submetida a deposição de ouro para melhor visualização, a estrutura observada não é esférica e também possui grande

variedade de tamanho. Faz-se, então, necessário estudos adicionais para adequar o procedimento de visualização da amostra obtida.

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de polibutílicoacrilato, (A) liofilizadas e (B) amostra líquida depositada em lâmina de vidro e seca a temperatura ambiente de $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Diante das considerações feitas anteriormente, foram feitos novos lotes da nanopartícula de polibutílicoacrilato e para a sua utilização na cultura celular, padronizou-se período de 15 minutos de exposição à luz ultravioleta, seguindo avaliação de sua esterilidade. Diante da confirmação do atributo de esterilidade, apenas uma alíquota da nanopartícula sintetizada foi submetida a liofilização para quantificação, para evitar que o restante da amostra sofresse com os efeitos do congelamento, tendo alteradas as suas características. Para garantir a estabilidade ao longo da utilização dos testes, foi feita a caracterização das nanopartículas em termos de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta a cada utilização.

Considerando a condição dos testes das nanopartículas serem diluídas em meio de cultura (DMEM+10% SFB), isto poderia afetar as suas características, tendo em vista que no meio de cultura há moléculas carregadas passíveis de aderirem às nanopartículas, como proteínas, podendo dessa forma, aumentar o seu tamanho e conseqüentemente, alterar o tipo de resposta em função da alteração de suas características quando no meio em que foram sintetizadas (ALEXIS et al., 2008; KANE;

STROOCK, 2007). Importantes propriedades afetadas pela agregação incluem estabilidade coloidal e homogeneidade, comportamento eletrônico e ótico, e outras propriedades que direcionam a nanopartícula para um alvo ou absorção a bactérias ou células, especialmente na presença de proteínas (JONES; GRAINGER, 2009). Por isso, a caracterização também foi feita com suspensões da nanopartícula no meio de cultura e neste caso, usando inclusive nanopartículas de maior tamanho, que não foram utilizadas para as análises com a cultura celular. Na tabela 3, há também a indicação do tempo máximo em que a caracterização das nanopartículas foi realizada (em relação a data em que foram obtidas), possibilitando condições de avaliar a sua estabilidade.

Tabela 3: Descrição dos valores obtidos quanto ao tamanho médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de polibutílcianoacrilato, assim como indicação do tempo máximo em que as características das nanopartículas foram analisadas em relação a data de sua obtenção. Amostras analisadas das nanopartículas obtidas sem serem submetidas a qualquer processo de esterilização e da amostra submetida a luz ultravioleta por 15 minutos.

Amostra	Tempo máximo de medição	Tamanho Médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
Original Lote 1	1 mês	157,5 – 172,9	0,111 – 0,165	-1,79
15min UV Lote 1	1 mês	157,8 – 168,8	0,050 – 0,158	-2,34
15min UV Lote 1+ Meio	3 semanas	158,3 - 160,0	0,142 - 0,250	-1,85
15min UV Lote 2	2 meses	188,1 – 188,6	0,018 – 0,085	0,0327
15min UV Lote 2+ Meio	2 meses	162,2	0,565	-3,45
Original Lote 3	1 mês	185,0 – 188,6	0,111 – 0,149	-0,78
15min UV Lote 3	1 mês	160,0 – 167,9	0,139 – 0,156	-0,715
15min UV Lote 3+ Meio	1 mês	147,2	0,622	-2,2
15min UV Lote 4 (liofilizado)	8 meses	353,4 – 354,2	0,177 – 0,205	-0,624
15min UV Lote 4+ Meio	8 meses	329,4	0,943	-4,28

Com a série de dados descritos na Tabela 3, é possível observar que mesmo em lotes diferentes de obtenção da nanopartícula e após aplicação do método de esterilização escolhido, o tamanho médio varia em torno de 160-190 nm, e os índices de polidispersão foram baixos, indicando homogeneidade no tamanho das partículas. Esses fatores pouco se alteraram, apesar do tempo decorrido após processo de

obtenção e previamente à avaliação, sendo 2 meses o maior período de armazenamento, em se tratando dos lotes que realmente foram utilizados na cultura celular. Inclusive, os tamanhos mostraram-se semelhantes ao primeiro resultado obtido com nanopartículas que não haviam sofrido qualquer processo de esterilização, ou liofilização (Tabela 2). O potencial zeta manteve-se negativo, porém muito baixo em módulo.

Avaliando os resultados das nanopartículas estéreis no meio de cultura, observa-se que não houve alteração significativa em seu tamanho médio. Houve, no entanto, pequena redução dimensional, fato oposto ao que se esperava, já que na presença de moléculas carregadas presentes no meio de cultura, estas poderiam aderir às nanopartículas, levando ao aumento do seu tamanho em função da agregação (ALEXIS et al., 2008; JONES; GRAINGER, 2009).

Um estudo de FANG et al. (2006) demonstrou que o tamanho da nanopartícula tem um efeito substancial na absorção de proteínas. Nanopartículas de poli(hexadecilcianoacrilato) com polietilenoglicol (PEG) pequenas (< 100 nm), médias (100-200 nm) e grandes (> 200 nm) incubadas com proteínas séricas por duas horas mostraram uma significativa correlação entre o tamanho da partícula e a absorção protéica. Absorção protéica em nanopartículas pequenas (80 nm) foi quantificada (6%) e comparada com a mesma formulação de nanopartículas com um tamanho maior (171 nm e 243 nm, 23% e 34%, respectivamente). No estudo com as nanopartículas de polibutílcianoacrilato que apresentam tamanho médio, poderia se considerar a ocorrência de uma absorção protéica mediana também. No entanto, o meio de cultura utilizado na cultura celular passa pelo processo de filtração esterilizante antes de seu uso, garantindo a ausência de moléculas de tamanho superior a 0,22 μm . Logo, as moléculas passíveis de adesão às nanopartículas seriam moléculas de menor tamanho.

Outra possibilidade para a evidência do tamanho ter sido mantido é que, como a nanopartícula apresentou baixo potencial zeta, a força atrativa de moléculas de carga oposta não foi tão expressiva que pudesse configurar adesão às nanopartículas. Ainda assim, a presença de tais moléculas altera o potencial zeta das nanopartículas, aumentando seu valor negativo. Isso faz sentido, considerando que o potencial zeta reflete o potencial da superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na

interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície das partículas ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MOSQUEIRA et al., 2000).

5.1.2. Poli- ϵ -caprolactona

A caracterização das nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona foi feita utilizando o aparelho Zetasizer. O tamanho médio obtido foi de 251,4 nm, com um índice de polidispersão de 0,155. O valor obtido encontra-se dentro da faixa descrita na literatura por outros autores (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996; FERRANTI *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002). Quanto ao índice de polidispersão o valor obtido foi baixo, indicando homogeneidade no tamanho das partículas.

O uso das nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona nos testes para avaliação da citotoxicidade teve por objetivo obter dados e, comparando os seus resultados com os da nanopartícula de polibutílcianoacrilato, selecionar para os testes subsequentes aquela que apresentasse perfil mais citotóxico, considerando os parâmetros estabelecidos, como, por exemplo, concentração empregada.

5.2. Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada pelo Teste MTT e pelo Teste Azul de Tripan. O Teste com MTT é um teste colorimétrico para medição da atividade de enzimas (desidrogenase mitocondrial) que reduzem MTT a produtos cromogênicos artificiais corados (cristais formazan arroxeados) (MOSMANN, 1983). O Teste de Exclusão com Azul de Tripan é um teste de viabilidade celular que se baseia na característica de que células desprovidas de membrana intacta são coradas, enquanto que as células viáveis

excluem o corante e permanecem não coradas, permitindo assim a contagem de células viáveis e não-viáveis.

5.2.1. Teste MTT

5.2.1.1. Nanopartículas de polibutílcianoacrilato

Os resultados obtidos nas três semanas de estudo, com dados de 24, 48 e 72 horas estão resumidos na Figura 3 contendo as informações principais, como IC_{50} em função do dia e no decorrer das semanas, assim como viabilidade e perfil morfológico obtido ao microscópio. A Figura 3 corresponde aos resultados obtidos nos testes iniciais, onde foram utilizadas as nanopartículas que foram liofilizadas, ressuspendidas e submetidas a 30 minutos de radiação UV, possuindo tamanho médio de 279,1 nm.

Ao analisar as fotos tiradas a cada dia e ao longo das semanas, é possível verificar que a partir de 75 $\mu\text{g/mL}$ da suspensão de nanopartículas de polibutílcianoacrilato há muitas células mortas, aumentando a incidência de morte com o aumento da concentração empregada. Esse perfil se repete ao longo dos dias e semanas.

Outro parâmetro observado foi o IC_{50} (concentração requerida para inibir 50% da função biológica ou bioquímica da população de estudo, no caso fibroblastos, em teste de duração especificada). Foi possível observar que na Semana 1, os resultados de IC_{50} para 48h e 72h estiveram em uma mesma faixa (100-120 $\mu\text{g/mL}$), diferindo do valor encontrado com 24h (70 $\mu\text{g/mL}$). É possível que esta diferença tenha ocorrido devido a algum problema no preparo da placa, em função da considerável diferença entre os resultados ao longo da Semana 1 e de todos os obtidos nas demais semanas. Em relação a Semana 2, os resultados de 24h, 48h e 72h estão na mesma faixa de IC_{50} ((100-110) $\mu\text{g/mL}$), semelhantes aos encontrados nas 48h e 72h da Semana 1. Um fato interessante observado na Semana 3 foi o decréscimo no IC_{50} ao longo dos dias,

indicando um incremento na citotoxicidade da nanopartícula ao longo dos dias (65-100 µg/mL). É possível que, em se tratando de uma amostra com um tamanho maior, índice de polidispersão também alto e um potencial zeta baixo e ainda, por ter sido liofilizada, esta amostra esteja com baixa estabilidade, conforme foi discutido anteriormente. Com o tempo de armazenamento pode haver maior concentração dos produtos de degradação no meio, possibilitando assim, um efeito tóxico ainda maior às células (LHERM *et al.*, 1992). Os resultados de IC₅₀ indicados na Figura 2 foram calculados pela transformação em Probitos utilizando o programa Statistica.

A Figura 3 ilustra, no formato de gráficos em barras e com a informação dos desvios padrão das leituras, os valores encontrados. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados (viabilidade celular - %) em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). Sendo assim, na maior parte dos resultados, na faixa de concentração de 1 a 50 µg/mL os perfis são semelhantes, começando a ser alterado a partir de 75 µg/mL, fator que também foi observado ao microscópio e tem sido encontrado em outros estudos (em hepatócitos, KANTE *et al.*, 1982; em fibroblasto fetal humano, GIPPS *et al.*, 1987; em fibroblasto L929, LHERM *et al.*, 1992).

Figura 3: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílcianoacrilato em linhagem de fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC₅₀ (µg/mL) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Os gráficos A, B e C referem-se aos resultados obtidos nas Semanas 1, 2 e 3, respectivamente. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

Com base nos resultados obtidos na obtenção da nanopartícula, foi possível padronizar para os testes em cultura celular a utilização, como método de esterilização, a exposição à irradiação UV durante 15 minutos e para a obtenção da massa da nanopartícula foi liofilizada apenas uma alíquota da amostra.

Após padronização do procedimento de obtenção da nanopartícula, os testes de MTT foram repetidos com as nanopartículas de tamanho médio entre 160-190 nm, conforme observado na Tabela 3. Os testes foram realizados em cultura de fibroblastos, de melanócitos e de melanoma. Optou-se por incluir no estudo uma linhagem imortalizada de células cancerosas com o objetivo de realizar uma prova de conceito, ou seja, buscando avaliar o risco do contato da nanopartícula de polibutílicoacrilato com as células transformadas, verificando se haveria indução do crescimento celular. Assim, os resultados obtidos nas três semanas de estudo, com dados de 24, 48 e 72 horas estão resumidos nas Figuras 4 e 5 (fibroblastos e melanoma, respectivamente), contendo as informações principais, como IC_{50} em função do dia ao longo das 3 semanas, assim como viabilidade e perfil morfológico obtido ao microscópio. Os resultados referentes às 3 semanas de estudo foram agrupados por apresentarem perfis semelhantes. Os resultados de IC_{50} indicados nas Figuras 5 e 6 foram calculados pela transformação em Probitos utilizando o programa Statistica.

Comparando inicialmente os resultados obtidos utilizando nanopartículas de 279,1 nm de tamanho, com as de tamanho médio entre (160-190) nm, pode-se observar que em se tratando de IC_{50} , o decréscimo que havia entre as semanas foi minimizado com os procedimentos adotados para melhorar a estabilidade da nanopartícula. No entanto, para a nanopartícula de tamanho menor observa-se uma pequena diminuição na faixa de IC_{50} , variando entre (80-100) $\mu\text{g/mL}$. Porém, uma característica observada em ambos os casos foi a da diminuição do IC_{50} ao longo dos dias. É possível que as células em contato com a nanopartícula no meio de cultura possam tornar-se mais suscetíveis ao efeito tóxico dos produtos de degradação.

Figura 4: Efeito citotóxico das nanopartículas de polibutílicoacrilato em linhagem de fibroblasto isolado de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílicoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC₅₀ (µg/mL) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Gráfico com dados de viabilidade celular (%) dos fibroblastos incubados com diferentes concentrações (µg/mL) de nanopartículas de polibutílicoacrilato. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

Figura 5: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutylcianoacrilato em cultura de melanoma (SK-Mel 103). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutylcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Gráfico com dados de viabilidade celular (%) das células de melanoma incubadas com diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de polibutylcianoacrilato. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

Comparando-se os resultados descritos nas Figuras 4 e 5, é possível observar o comportamento de diferentes tipos celulares diante das nanopartículas de polibutylcianoacrilato, no caso de fibroblastos e melanoma. Dessa forma, as células de melanoma apresentam IC_{50} entre (55-60) $\mu\text{g/mL}$, faixa que se manteve ao longo dos

dias e semanas, e bem menor do que a encontrada para os fibroblastos. Sendo assim, as células de melanoma foram mais suscetíveis às nanopartículas de polibutilcianoacrilato do que os fibroblastos. Esse comportamento também pode ser visualizado na Figura 6, que mostra a placa de 96-well usada para o teste de MTT com os cristais de formazan arroxeados já solubilizados por DMSO. Com o aumento da concentração de nanopartículas de polibutilcianoacrilato, menor é a coloração dos poços, indicando menor quantidade de cristais formazan formados. Há nesta figura a indicação em uma das colunas do teste realizado com Dextran (1%), para garantir que o efeito citotóxico observado seria unicamente das nanopartículas e não de possíveis resíduos do processo de obtenção das mesmas. Os resultados indicaram perfil da coluna correspondente ao Dextran 1% semelhante ao grupo “Não Tratado”, nos dois tipos celulares.

Figura 6: Placa de 96-well utilizada no teste de MTT. Com o aumento da concentração de nanopartículas de polibutilcianoacrilato, a coloração dos poços se torna menos intensa, indicando uma menor formação de cristais de formazan. Diferença observada entre os tipos celulares (fibroblasto e melanoma). As células de melanoma demonstram perfil mais suscetível à amostra.

As Figuras 4 e 5 também apresentam, no formato de gráficos em barras e com a informação dos desvios padrão das leituras, os valores obtidos. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados (viabilidade celular - %) em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). No gráfico que indica o perfil de viabilidade celular em fibroblastos, na faixa de concentração de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ os perfis são semelhantes, começando a ser alterado a partir de 75 $\mu\text{g/mL}$, fator observado semelhantemente ao dos resultados com a nanopartícula de tamanho maior. No caso das células de melanoma, os resultados demonstram um perfil semelhante na faixa de 1 a 25 $\mu\text{g/mL}$, alterando de 50 $\mu\text{g/mL}$ em diante, porém, nas concentrações mais elevadas também apresentaram perfis semelhantes, como 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$.

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de polibutílicoacrilato usadas no tratamento de linhagem de melanócitos, indicando os valores de IC_{50} encontrados para os testes realizados em 24, 48 e 72 horas, que foram calculados pela transformação em Probitos utilizando o programa Statistica. Os resultados foram ilustrados no formato de gráficos em barras e com a informação dos desvios padrão das leituras, os valores encontrados. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados (viabilidade celular - %) em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

Comparando os resultados obtidos com fibroblastos, melanomas e melanócitos, já havia sido discutido que as células de melanoma apresentaram faixa de IC_{50} ao longo dos dias ((55-60) $\mu\text{g/mL}$) menor do que os fibroblastos ((80-100) $\mu\text{g/mL}$). Com os dados indicados na Figura 7, é possível verificar que os melanócitos apresentam faixa ainda menor ((40-55) $\mu\text{g/mL}$) que as células de melanoma, indicando uma maior susceptibilidade dos melanócitos ao efeito citotóxico das nanopartículas de polibutílicoacrilato.

Figura 7: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílicoacrilato em cultura de melanócito (FM 305). Resultados de viabilidade celular (%) e IC₅₀ (µg/mL) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT estão descritos. Gráfico com dados de viabilidade celular (%) das células de melanócito incubadas com diferentes concentrações (µg/mL) de nanopartículas de polibutílicoacrilato. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

5.2.1.2. Nanopartículas de poli-ε-caprolactona

Os resultados obtidos nas duas semanas de estudo, com dados de 24, 48 e 72 horas estão resumidos na Figura 8, com as informações principais, como viabilidade em função do dia e no decorrer das semanas e perfil morfológico obtido ao microscópio. Também ilustra, no formato de gráficos em barras e com a informação dos desvios padrão das leituras, os valores obtidos. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados (viabilidade celular - %) em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). Sendo assim, na maior parte dos resultados, na faixa de concentração de 1 a 100 µg/mL os perfis são semelhantes, começando a ser alterado a partir de 200 µg/mL. Em alguns casos a faixa de concentração de 50 a 200 µg/mL também apresentou perfis semelhantes, aspecto que também foi observado ao microscópio.

Figura 8: Efeito citotóxico da nanopartícula de poli-ε-caprolactona em fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de poli-ε-caprolactona na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Gráficos com dados de viabilidade celular (%) a partir dos valores de absorbância obtidos no Teste com MTT com diferentes concentrações (µg/mL) de nanopartículas de poli(ε-caprolactona). Os gráficos A e B referem-se aos resultados obtidos nas Semanas 1 e 2, respectivamente. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

Considerando que não houve alteração significativa na viabilidade celular (%) com as concentrações estipuladas para serem as utilizadas nos testes tanto para as nanopartículas de polibutilcianoacrilato, como para as de poli(ε-caprolactona), não foi possível estimar o IC₅₀ (µg/mL) utilizando os resultados obtidos. Haveria a necessidade de submeter as células a concentrações mais elevadas de nanopartículas de poli(ε-

caprolactona) comparativamente às utilizadas, condição não inclusa no objetivo do estudo. As nanopartículas poliméricas, e nesse caso, as biodegradáveis, são de forma geral, biocompatíveis (NAIR; LAURENCIN, 2007). Nesse caso, buscou-se aquelas que apresentassem um perfil mais citotóxico, ainda que baixo, mas que pudesse ser avaliado nas concentrações estipuladas para o tipo celular escolhido em monocamada. Dessa forma, escolheram-se as nanopartículas de polibutilcianoacrilato para prosseguir com o estudo. Tendo os testes preliminares definido a nanopartícula de escolha e também, o perfil de viabilidade celular (%) com as concentrações de teste, a partir destes dados tornou-se possível definir as condições para os testes na cultura tridimensional.

5.2.2. Teste Azul de Tripan

5.2.2.1. Nanopartículas de polibutilcianoacrilato

5.2.2.1.1. Cultura em monocamada de fibroblasto, melanócito e melanoma

Os resultados obtidos nas duas semanas de estudo, com dados de 24, 48 e 72 horas estão resumidos na Figura 9, com as principais informações, como IC_{50} em função do dia e no decorrer das semanas, assim como viabilidade e perfil morfológico obtido ao microscópio. Vale ressaltar que as Semanas 1 e 2 deste ensaio equivalem às semanas 2 e 3 do Teste de MTT (descrito na Figura 3), em termos de tempo de armazenamento e estabilidade das nanopartículas de polibutilcianoacrilato. A Figura 9 corresponde aos resultados obtidos nos testes iniciais, onde foi utilizada a nanopartícula liofilizada, ressuspensa e submetida a 30 minutos de radiação UV, possuindo tamanho médio de 279,1 nm.

Figura 9: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílicoacrilato em fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílicoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X. Resultados de viabilidade celular (%) e IC₅₀ (µg/mL) a partir dos valores referentes à contagem de células vivas e mortas obtidos no Teste com Azul de Tripán estão descritos. Os gráficos A e B referem-se aos resultados obtidos nas Semanas 1 e 2, respectivamente. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

Ao analisar as fotos obtidas a cada dia e ao longo das semanas, é possível verificar a partir de 50 µg/mL uma mudança na morfologia das células. O fibroblasto que é uma célula alongada, a partir de 50 µg/mL aparece com o conteúdo citoplasmático

mais expandido. A partir de 75 $\mu\text{g/mL}$ da solução de nanopartículas de polibutílcianoacrilato há muitas células mortas, aumentando a incidência de letalidade com o aumento da concentração empregada. Esse perfil se repete ao longo dos dias e semanas.

Outro parâmetro observado foi o IC_{50} (concentração requerida para inibir 50% da função biológica ou bioquímica da população de estudo, no caso fibroblastos, em teste de duração especificada). Os resultados de IC_{50} indicados na Figura 10 foram calculados pela transformação em Probitos utilizando o programa Statistica. Os resultados obtidos permitiram observar que nas Semanas 1 e 2, os valores de IC_{50} de 24, 48h e 72 estiveram em uma mesma faixa ((90-120) $\mu\text{g/mL}$), sendo que no caso da Semana 2, o IC_{50} foi decrescendo um pouco mais que na Semana 1. Comparativamente com os resultados de MTT da Semana 2 com os da Semana 1 do Teste com Azul de Tripán, que se equivalem, os resultados também são semelhantes em termos de decréscimo no IC_{50} , porém, os valores foram menores para o Teste de MTT. Da mesma forma, o fato interessante observado na Semana 3 com o Teste de MTT - o decréscimo no IC_{50} ao longo dos dias, indicando uma maior citotoxicidade da nanopartícula ao longo dos dias – foi observado na Semana 2 com o Teste Azul de Tripán, para testes feitos com nanopartículas sob condições equivalentes de armazenamento e estabilidade. A discussão feita para o Teste de MTT se aplica aqui também, pelas mesmas razões descritas anteriormente.

De maneira similar à avaliação realizada com o Teste MTT, no caso do Teste com Azul de Tripán, a Figura 9 ilustra os resultados no formato de gráficos em barras e com a informação dos desvios padrão das leituras. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados (viabilidade celular - %) em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). Sendo assim, na maior parte dos resultados, na faixa de concentração de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ os perfis são semelhantes, assim como os perfis em 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

O Teste de Azul de Tripán, por permitir a contagem de células viáveis e não viáveis (totais), possibilita a avaliação do perfil de proliferação das células e o efeito das

diferentes concentrações da nanopartícula de polibutilcianoacrilato sobre a proliferação celular (Figura 10).

Figura 10: Perfil de proliferação de fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2) incubados com nanopartículas de polibutilcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). A e B indicam dados referentes às Semanas 1 e 2, respectivamente.

Com base nas informações fornecidas na Figura 10, é possível verificar o efeito das nanopartículas na proliferação celular. Até a concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, o perfil de proliferação apresentou-se semelhante, reduzindo com $25 \mu\text{g/mL}$. De $50 \mu\text{g/mL}$ em diante, houve uma redução ainda maior na proliferação, mas com perfis semelhantes entre as concentrações ($50, 75, 100$ e $200 \mu\text{g/mL}$). Esta característica pode ser observada nas duas semanas de estudo. Sendo assim, nas condições de estudo, pode-se verificar que para essas células cultivadas em monocamada, a incubação com nanopartículas de polibutilcianoacrilato alteraram o perfil de proliferação das células, inibindo-o em concentrações a partir de $25 \mu\text{g/mL}$.

De maneira semelhante ao que foi descrito para o Teste de MTT, no caso do Teste Azul de Tripán também foram realizados novos testes com nanopartículas de menor tamanho, utilizando culturas celulares de fibroblasto, melanócito e melanoma. Os resultados correspondentes a cada tipo celular estão descritos nas Figuras 12, 13 e 14, para fibroblastos, melanoma e melanócitos, respectivamente e os resultados de IC_{50} foram calculados pela transformação em Probitos utilizando o programa Statistica.

Figura 11: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutircianoacrilato em fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2). O efeito de diferentes concentrações de nanopartículas de polibutircianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X.

Figura 12: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutircianoacrilato em células de melanoma (SKMel-103). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutircianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X.

Diante dos resultados descritos nas Figuras 11 e 12, verifica-se que novamente o IC₅₀ ao longo dos dias decai. Porém comparando com os resultados obtidos utilizando cultura de fibroblastos em contato com a nanopartícula de tamanho maior, o IC₅₀ encontrado no último caso é maior, demonstrando ser a amostra padronizada para os

testes menos citotóxica que a de tamanho maior, liofilizada e com 30 minutos de exposição a UV. As razões para este fato já foram discutidas anteriormente.

No caso da Figura 12, que evidencia os resultados obtidos com cultura de melanoma, apresentou uma variação do IC_{50} numa faixa de (85-115) $\mu\text{g/mL}$, menor que a obtida para fibroblastos ((110-150) $\mu\text{g/mL}$), demonstrando novamente que nanopartículas de polibutilcianoacrilato são mais citotóxicas para melanoma do que para fibroblastos, como também foi observado no Teste de MTT. Somando-se a esses resultados os obtidos para cultura de melanócitos (faixa de IC_{50} variando ao longo dos dias de 35 a 50 $\mu\text{g/mL}$ – Figura 13), este tipo celular mostrou-se ainda mais suscetível às nanopartículas de polibutilcianoacrilato do que as células de melanoma.

Figura 13: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutilcianoacrilato em melanócitos isolados de cultura primária (FM 305). O efeito de diferentes concentrações de nanopartícula de polibutilcianoacrilato na morfologia celular pode ser acompanhado pelas imagens obtidas ao microscópio (Eclipse TS 100, Nikon), aumento de 10X.

Comparando os resultados obtidos com o Teste de Azul de Tripán com os obtidos com o Teste de MTT, os valores de IC_{50} foram maiores (com exceção da cultura de melanócitos), embora o perfil do IC_{50} tenha sido decrescente ao longo dos dias em ambos os casos.

No entanto, os dois tipos de testes escolhidos para avaliar a viabilidade celular não apresentaram resultados coincidentes para os dois tipos celulares. Isso pode ocorrer devido ao fato de possuírem mecanismos diferentes que respondem como viabilidade celular. O Teste de MTT é um teste que atua avaliando o metabolismo celular, já que mede a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial em células que estão proliferando, pela redução do corante (CIAPETTI, 1992; BERRIDGE; TAN, 1993). A Figura 14 permite observar que, embora o perfil de proliferação em 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ (para fibroblastos) e em 50 $\mu\text{g/mL}$ (para melanoma) seja consideravelmente diferente do grupo controle (não tratado), o percentual de viabilidade celular é estatisticamente semelhante ao do grupo controle, ou então, ainda possui um percentual de viabilidade elevado. O gráfico indica que até 25 $\mu\text{g/mL}$ (para fibroblastos), 10 $\mu\text{g/mL}$ (para melanoma) e 1 $\mu\text{g/mL}$ (para melanócitos) a proliferação celular é semelhante ao Controle (NT – Não Tratado). Em 50 $\mu\text{g/mL}$ (para fibroblasto), 25 $\mu\text{g/mL}$ (para melanoma) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (para melanócitos), há uma redução na proliferação celular, e com as concentrações seguintes ainda mais intensa, porém com perfil de proliferação semelhante entre si. As fotos presentes nas Figuras 11 a 13 também permitem essa visualização em termos de proliferação nas faixas indicadas anteriormente.

Com base nessas evidências, é possível considerar a diferença nos resultados de MTT e Tripán. No caso do Teste de MTT, em função de que nas maiores concentrações há menos células realizando a redução do corante, a resposta de absorbância comparada a do grupo controle e de menores concentrações da amostra é menor, evidenciando não necessariamente morte, mas que em concentrações maiores, as células proliferam menos. Como no Tripán o cálculo é percentual, em todas as concentrações, considera o número de células vivas (membrana intacta) em relação às totais, sempre dando uma resposta de viabilidade, independente da alteração da proliferação celular em função da amostra. Por essa razão, optou-se por considerar os

Figura 14: (A) Perfil de proliferação de fibroblastos isolados de cultura primária (FP#2), melanoma (SK-Mel-103) e melanócitos isolados de cultura primária (FM 305) incubados com nanopartículas de polibutílicoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de fibroblastos, melanoma e melanócito. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

valores de IC_{50} obtidos pelo Teste de Azul de Tripán para dar prosseguimento ao estudo, na avaliação do tipo de morte.

5.2.2.1.2. Cultura tridimensional: Equivalente dérmico

O Teste de Azul de Tripán foi realizado também na cultura celular de fibroblastos imersa na matriz de colágeno tipo I, permitindo às células ambiente de crescimento tridimensional. A Figura 15 descreve os resultados obtidos de percentual de viabilidade celular, assim como informação de IC_{50} , calculados pela transformação em Probitos, utilizando o programa Statistica. Outra informação apresentada na Figura 15 é o perfil da cultura celular na placa de 24-well após 24 horas de tratamento. Visualmente, é possível observar que até 50 $\mu\text{g/mL}$ há contração do colágeno polimerizado. Isso indica que as células de fibroblastos viáveis não sofreram alteração em seu potencial para organizar a matriz ao seu redor, levando a um aumento proximal na densidade das fibrilas colágenas, resultando em uma correspondente diminuição do volume da mesma (contração) (BOGGIO et al., 2009; EHRLICH, 1988). Os fibroblastos são capazes de interagir com fibrilas colágenas, produzindo um denso arranjo das mesmas. O grau e extensão da contração podem ser regulados pelo conteúdo protéico e pelo número de células na matriz (BELL; IVARSSON; MERRILL, 1979). Com as concentrações mais elevadas das nanopartículas de polibutílcianoacrilato este perfil de contração foi consideravelmente inibido, em função do número reduzido de células viáveis. A Figura 16 demonstra o efeito das maiores concentrações no perfil de proliferação. O gráfico indica que até 50 $\mu\text{g/mL}$ a proliferação celular é semelhante ao Controle (NT – Não Tratado). Em 100 $\mu\text{g/mL}$ há uma redução na proliferação celular, e nas concentrações seguintes ainda mais intensa.

Os resultados de IC_{50} indicam faixa um pouco maior ((115-155) $\mu\text{g/mL}$) do que a obtida com a cultura de fibroblastos em monocamada ((110-150) $\mu\text{g/mL}$). Nesta situação, em termos de IC_{50} , houve uma pequena redução dos efeitos tóxicos em função da necessidade de maior concentração para se obter inibição de 50% das

células comparativamente à cultura em monocamada. Este efeito redutor da citotoxicidade é melhor evidenciado observando-se o percentual de viabilidade na maior concentração estudada (200 $\mu\text{g/mL}$). Considerando-se os perfis de proliferação dos fibroblastos, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, a proliferação é inibida em monocamada, enquanto que no ambiente tridimensional apresenta perfil semelhante ao do grupo não tratado.

Figura 15: Efeito citotóxico da nanopartícula de polibutílcianoacrilato em cultura tridimensional de fibroblasto (FP#2) – equivalente dérmico. Resultados de viabilidade celular (%) e IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) a partir dos valores referentes à contagem de células vivas e mortas obtidos no Teste com Azul de Tripán estão descritos. (A) Perfil de proliferação de fibroblastos em cultura tridimensional incubados com nanopartículas de polibutílcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de fibroblastos em cultura tridimensional. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student).

O desenvolvimento de ambientes tridimensionais buscando mimetizar o que ocorre *in vivo* tem encontrado resultados indicando a redução de efeitos tóxicos em culturas 3D quando comparado com seus resultados em monocamada (LEE et al., 2009; SANTOS, 2011). As células no corpo residem em um ambiente tridimensional,

que é crítico para seu crescimento e metabolismo. O fenótipo e função de células individuais são altamente dependentes das interações com proteínas da matriz extracelular organizada tridimensionalmente e com células vizinhas. Entretanto, essas interações células-célula e célula-matriz são consideravelmente reduzidas no caso de cultura celular 2D em um substrato plano, que por sua vez, limita significativamente sua capacidade de retomar o nível apropriado de respostas celulares *in vivo* (LEE et al., 2009; LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Assim, modelos *in vitro* de cultura celular 3D tem sido introduzidos para preencher as frequentes lacunas entre modelos *in vitro* de cultura celular 2D e modelos *in vivo*. Estudos em toxicidade testando nanopartículas magnéticas (PISANIC II et al., 2007), nanotubos de carbono (MAGREZ et al., 2006) e fulerenos (SAYES et al., 2004) usando cultura celular 2D mostraram altos efeitos citotóxicos. Entretanto, quando eles foram testados em modelos animais, nenhum efeito adverso foi encontrado (ZHANG et al, 2007b; SAYES et al., 2007; KIM et al., 2006). No caso de nanopartículas de polibutílcianoacrilato, esta diferença também foi constatada (FERNANDEZ-URRUSUNO et al., 1995; COUVREUR; VAUTHIER, 1991). No modelo estudado neste trabalho, em termos de IC₅₀, essa grande diferença em resultados entre 2D e 3D não foi observada para os tipos celulares em questão e diante da metodologia utilizada. No entanto, os dados de viabilidade celular na maior concentração testada (200 µg/mL) demonstram diferença na resposta celular, indicando que no ambiente tridimensional as células apresentam maior sobrevivência diante da alta concentração de nanopartículas de polibutílcianoacrilato, comparativamente aos resultados obtidos em monocamada. Os dados de proliferação demonstram que o ambiente 3D permitiu que as células não tivessem seu perfil de proliferação alterado até a concentração de 50 µg/mL, fato que na monocamada aconteceu até 25 µg/mL.

5.2.2.1.3. Cultura tridimensional de células de melanoma

O Teste de Azul de Tripán foi realizado também na cultura celular de melanoma na matriz de colágeno tipo I após 5 dias de incubação, quando se proporcionou às

células ambiente de crescimento tridimensional. A decisão de se manter 5 dias em incubação teve por intuito permitir a invasão das células de melanoma no colágeno, tendo em vista o estudo realizado por Santos (2011) que constatou haver, a partir do quinto dia, o estabelecimento de crescimento com invasão verticalizada para o interior do colágeno. A Figura 16 descreve em (A) o perfil de proliferação celular de melanoma em cultura tridimensional incubados com as diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílcianoacrilato ao longo de 3 dias e em (B) os resultados obtidos de percentual de viabilidade celular, assim como informação de IC_{50} , calculados pela transformação em Probitos, utilizando o programa Statistica. Não foi possível a inclusão de fotos neste caso, em função da espessa camada de colágeno utilizada no teste, que inviabilizou a visualização celular em microscópio óptico. O gráfico indica que em 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ a proliferação celular é semelhante entre si e diferentes do Controle (NT – Não Tratado). O perfil celular em 200 $\mu\text{g/mL}$ não segue o padrão observado nas demais concentrações de estudo.

Figura 16: (A) Perfil de proliferação de células de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional (matriz de colágeno tipo I) incubadas com nanopartículas de polibutílcianoacrilato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). A tabela indica os valores de IC_{50} ao longo dos dias.

Os resultados obtidos demonstram diferença entre os resultados obtidos no Teste de Azul de Tripán em monocamada. A faixa de IC_{50} obtida em monocamada foi

de (85-115) $\mu\text{g/mL}$ e a faixa em ambiente tridimensional foi de (95-125) $\mu\text{g/mL}$, semelhante à diferença constatada entre fibroblasto em monocamada e no equivalente dérmico. O decréscimo do IC_{50} ao longo dos dias é observado, mais claramente em 72 horas, pois entre 24 e 48 horas, o valor de IC_{50} foi mantido. Porém, de forma distinta do observado com fibroblastos, o perfil de proliferação de células de melanoma em ambiente tridimensional indica que, embora tenha ocorrido o aumento da morte celular com o aumento da concentração de nanopartículas, as concentrações utilizadas não alteraram significativamente a proliferação celular. Tal fato sugere que o ambiente tridimensional tenha fornecido às células de melanoma condições de ter sua proliferação não alterada, como ocorreu em monocamada ou com os fibroblastos (nas maiores concentrações).

5.2.2.1.4. Cultura tridimensional: Melanoma sobre equivalente dérmico

A avaliação da viabilidade celular por meio do Teste de Azul de Tripán também foi realizada para a cultura de melanoma (SK-Mel-103) cultivados sobre cultura de fibroblastos em matriz de colágeno tipo I (equivalente dérmico). A Figura 17 apresenta os resultados obtidos, descrevendo em (A) o perfil de proliferação de ambas as células mediante contato com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílcianoacrilato ao longo de 72 horas e em (B) os valores de viabilidade celular (%) obtidos para cada concentração e ao longo dos dias, assim como os valores de IC_{50} calculados por transformação em Probitos, pelo programa Statistica.

Os resultados demonstram que a faixa de IC_{50} encontrada neste caso é de (75-100) $\mu\text{g/mL}$, valores que mais se aproximam aos obtidos no Teste de Azul de Tripán com células de melanoma em monocamada ((85-115) $\mu\text{g/mL}$). Isso pode ser justificado pelo fato deste experimento ter sido realizado com a adição das concentrações de nanopartícula de polibutílcianoacrilato 24 horas após o plaqueamento das células. Assim, é possível que as células ainda estivessem aderidas apenas à superfície da matriz.

O perfil decrescente dos valores de IC_{50} ao longo dos dias é mantido também neste experimento, fortalecendo a hipótese anteriormente discutida do aumento da quantidade de produtos de degradação tóxicos no decorrer do tempo (COUVREUR; VAUTHIER, 1991).

Figura 17: (A) Perfil de proliferação de células de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional (equivalente dérmico) incubadas com nanopartículas de polibutílicoacrilato em diferentes concentrações (µg/mL). (B) Gráfico com dados de viabilidade celular (%) de melanoma (SK-Mel-103) em cultura tridimensional. Os asteriscos sobre as barras indicam os grupos de dados em que não houve evidências estatísticas significativas que possibilitassem a rejeição da hipótese de que suas médias fossem iguais ($p < 0,01$, Teste t-Student). A tabela indica os valores de viabilidade celular (%) e a indicação dos valores de IC_{50} ao longo dos dias.

5.3. Testes para avaliação do tipo de morte celular

5.3.1. FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) para identificação do tipo de morte celular

Com o intuito de se caracterizar o tipo de morte celular utilizou-se o citômetro de fluxo, um aparelho que permite avaliar a emissão de fluorescência das células (FACS –

Fluorescence Activated Cell Sorter). Portanto, para marcação celular foram utilizados os fluoróforos Anexina V-FITC ou Anexina V-APC e iodeto de propídeo (IP) (com leitura nos comprimentos de onda para FITC/APC e Perc-P, respectivamente), sendo que por meio da marcação dupla é possível diferenciar o comportamento das células em apoptose, necrose ou apoptose tardia.

A Anexina V é uma proteína que combinada com fluoróforo atua como marcador de apoptose, por sua alta afinidade pela fosfatidilserina. Fosfatidilserina é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular permanece intacta apesar de ter sofrido uma desorganização, a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada. Mudanças nesta assimetria da membrana, analisadas através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. Para caracterização do processo de necrose, utilizou-se iodeto de propídeo que foi incorporado por células que possuíam ácidos nucleicos expostos, indicando rompimento da membrana celular (BAATOUT; DERRADJI, 2004).

O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o iodeto de propídeo, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Havendo dupla marcação tem-se indicado o processo de apoptose tardia com exposição do receptor de fosfatidilserina e a marcação do ácido nucleico. As células que não apresentam a externalização do receptor e possuem a membrana celular íntegra são células viáveis e não incorporam o fluoróforo (GIVAN, 2001).

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos para a caracterização do tipo de morte. Em (B) estão plotados os dados presentes em (A), informando o percentual de células conforme a sua marcação, ou ausência da mesma. Os dados mostram que com

o aumento da concentração de nanopartículas de polibutílcianoacrilato, há o aumento do percentual de morte, fato igualmente observado nos testes de MTT e Azul de Tripan. Os resultados sugerem que a morte é via apoptose tardia. O mesmo fenômeno pode ser observado na Figura 19 com a cultura celular de melanoma, com conclusões semelhantes.

Figura 18: (A) Caracterização do tipo de morte celular de fibroblastos cultivados em monocamada, incubados com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílcianoacrilato (100 e 142 µg/mL) em comparação com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).

Figura 19: (A) Caracterização do tipo de morte celular de células de melanoma cultivadas em monocamada incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílicoacrilato (80, 93 e 104 $\mu\text{g/mL}$) comparados com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).

Com o intuito de se verificar o comportamento das células em ambiente tridimensional, considerando a avaliação do tipo de morte diante do tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílicoacrilato, o teste foi realizado com a cultura tridimensional de fibroblastos (equivalente dérmico) e de melanoma. Os resultados estão descritos nas Figuras 20 e 21, para o equivalente dérmico e melanoma em cultura tridimensional, respectivamente. Com base nos resultados, observou-se que o grupo não tratado apresentou um percentual de morte muito elevado em ambos os casos, fato que levou à investigação do possível interferente para esta análise, já que com esse resultado, não é possível considerar o percentual de morte para os casos tratados.

Figura 20: (A) Caracterização do tipo de morte celular de células de fibroblasto cultivadas em ambiente tridimensional (equivalente dérmico) incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílicoacrilato (100 e 150 $\mu\text{g/mL}$) comparados com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).

Buscando-se investigar a origem da interferência, foi feita a análise nas mesmas condições dos testes acima, porém sem a presença das células, para avaliar a influência do colágeno nas medições. O resultado está descrito na Figura 22.

Figura 21: (A) Caracterização do tipo de morte celular de células de melanoma cultivadas em ambiente tridimensional incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polibutílicoacrilato (80, 100 e 125 µg/mL) comparados com o Controle Não Tratado. (B) Dados plotados da figura (A) referente à porcentagem de células em 10.000 eventos apresentando dupla marcação (Apoptose tardia – Anexina V+PI), marcadas apenas com Anexina V (Apoptose), marcadas apenas com iodeto de propídeo (Necrose) ou não marcadas (vivas).

Figura 22: Diagramas obtidos pela passagem de colágeno no citômetro de fluxo após marcação, evidenciando que o colágeno é marcado pela Anexina V, emitindo fluorescência.

Observando os diagramas obtidos pela passagem do colágeno no citômetro de fluxo, é possível verificar que o colágeno emite fluorescência por se ligar a Anexina V, fato que levou ao aumento dos valores obtidos de percentual de morte por apoptose ou apoptose tardia nos grupos celulares considerados. No caso dos resultados obtidos com equivalente dérmico, pôde-se observar que quanto menor foi a concentração de nanopartículas de polibutílicoacrilato utilizadas, maiores foram os índices de morte por apoptose tardia. Isso pode ser justificado devido ao fato de quanto mais células vivas, mais os fibroblastos podem contribuir para a deposição de colágeno e assim, aumentar a concentração de colágeno, levando a uma maior fluorescência pela marcação pela Anexina V.

Na Figura 23, buscou-se avaliar a influência da voltagem na resposta da emissão do sinal de fluorescência e observou-se que quanto maior a voltagem utilizada, maior a emissão de fluorescência proveniente da marcação da Anexina V no colágeno, fato que não foi observado com o iodeto de propídeo. Mas em ambas as voltagens, há a emissão da fluorescência da Anexina V ligada ao colágeno.

Dessa forma, a metodologia utilizada não é adequada para a avaliação do tipo de morte celular em se tratando de ambiente tridimensional desenvolvido com a utilização de colágeno tipo I.

Figura 23: Histograma indicativo da influência da voltagem utilizada no citômetro de fluxo na resposta da emissão da fluorescência dos marcadores ligados ou não ao colágeno.

5.3.2. Quantificação de vacúolos autofágicos por citometria de fluxo

A autofagia é um processo celular fisiológico para degradação e reciclagem de componentes do citoplasma e organelas celulares danificadas, para manutenção da homeostase celular em condições adversas como privação de nutrientes, presença de

patógenos e toxinas. Porém, quando o processo ultrapassa um determinado limiar, pode levar ao processo de morte autofágica. A autofagia é caracterizada pela formação de vacúolos autofágicos (autofagossomos e autolisossomos) (RUBINSZTEIN et al., 2007). Por serem essas organelas ácidas, utiliza-se o corante fluorogênico acidotrópico alaranjado de acridina (*Acridine Orange*), que marca especificamente tais ambientes celulares. O alaranjado de acridina cora o citoplasma e núcleo celulares com fluorescência verde e, quando em ambiente ácido, sofre modificações físico-químicas e passa a emitir fluorescência vermelha. A intensidade de fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez das vesículas. Assim, as células verdes e com fluorescência vermelha elevada são caracterizadas como células realizando autofagia, podendo essa porcentagem ser determinada por citometria de fluxo.

Para o teste realizado com fibroblastos, comparando com o percentual de células em processo autofágico sob situação de não tratamento com o emprego de nanopartículas de polibutílcianoacrilato nas concentrações de 25, 50, 100, 125 e 149 µg/mL, para concentrações até 50 µg/mL, houve indução de autofagia. Nas concentrações iguais ou superiores a 100 µg/mL, há considerável redução numérica de células em processo autofágico, caracterizando concentrações de inibição da autofagia (Figura 24).

Figura 24: Gráficos obtidos na citometria de fluxo para fibroblastos cultivados em monocamada que indicam no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.

Avaliando os resultados obtidos para o teste realizado com fibroblastos em cultura tridimensional, comparando com o percentual de células em processo autofágico sob situação de não tratamento com o emprego de nanopartículas de polibutilcianoacrilato nas concentrações de 25, 50, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$, para concentrações até 100 $\mu\text{g/mL}$, houve indução de autofagia. Nas concentrações iguais ou superiores a 125 $\mu\text{g/mL}$, há gradativa redução numérica de células em processo autofágico conforme o aumento da concentração de nanopartículas de polibutilcianoacrilato, caracterizando concentrações de inibição da autofagia (Figura 25).

Figura 25: Gráficos obtidos na citometria de fluxo para fibroblastos em cultura tridimensional que indicam no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.

Assim, pôde-se observar que há diferenças de resposta celular comparando os ambientes de cultura celular (monocamada e tridimensional), em que, por exemplo, na concentração de 100 µg/mL de nanopartículas de polibutílicoacrilato, enquanto na cultura em monocamada esta foi uma concentração inibitória da autofagia, em ambiente tridimensional foi concentração indutora da autofagia. Porém, nas concentrações mais altas utilizadas, o perfil foi o mesmo (inibitório).

No caso do teste realizado com células de melanoma em monocamada, também foi observada redução do percentual de células em processo autofágico, que foi maior conforme o aumento da concentração utilizada (114 µg/mL e 150 µg/mL) (Figura 26).

Figura 26: Gráfico obtido na citometria de fluxo para células de melanoma em monocamada que indica no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.

Figura 27: Gráfico obtido na citometria de fluxo para células de melanoma em cultura tridimensional que indica no maior quadrante o percentual de células que são coradas em verde e em vermelho simultaneamente, indicando processo autofágico.

Em se tratando dos resultados obtidos para os melanomas em cultura tridimensional, avaliando as concentrações até 50 $\mu\text{g/mL}$, não há grandes diferenças comparativamente ao grupo não tratado. Entre 50 e 114 $\mu\text{g/mL}$ houve um perfil indutor da autofagia e a partir da maior concentração testada, 125 $\mu\text{g/mL}$, um perfil inibitório, ainda que percentualmente não tão expressivo (Figura 27). De forma semelhante ao que foi observado com a cultura de fibroblastos, o perfil das células em processo autofágico foi diferente conforme o ambiente em que foram cultivadas.

A ocorrência da inibição da autofagia nos tipos celulares estudados é um dado interessante, uma vez que tem sido objeto de estudos nos quais, por vezes, a autofagia não induz à morte, mas à sobrevivência das células. No caso de células cancerosas, a autofagia pode promover ou prevenir seu crescimento. Ela atua como supressora de

tumores quando limita o tamanho da célula e remove os componentes danificados que poderiam gerar radicais livres ou criar mutações. Mas também pode proteger as células cancerígenas contra alguns tratamentos e poderia mantê-las viáveis ao reciclar as organelas em seu interior. Assim, é possível que compostos antitumorais tornem-se mais efetivos numa situação de inibição da autofagia (MASSARO, 2009). Com os resultados obtidos, mostra-se a importância da avaliação da resposta das células quando cultivadas em ambientes diferentes (monocamada ou cultura tridimensional), uma vez que o perfil de resposta pode ser antagônico numa avaliação da mesma concentração de determinado material (por exemplo, nanoparticulado) para um mesmo tipo celular.

A expectativa de que as culturas celulares em 3D, nos seus distintos modelos e configurações possam caracterizar situação de interações com proteínas da matriz extracelular, assim como fluidos intercelulares possam simular modelos de avaliação *in vivo*, conduz a pesquisas intensas neste sentido. Apesar de alguns resultados promissores, evidenciando proximidade ao sistema animal, outros que inserem a comparação com avaliações *in vivo* trazem dúvidas cruciais ao sucesso pleno de tal desafio.

Entretanto, ainda que não se atinja o ideal da plena simulação, é inquestionável o avanço proporcionado pelos estudos desenvolvidos em estruturas celulares 3D no sentido de elucidar mecanismo de ação ou de morte acarretados pelos distintos agentes citotóxicos. Ainda, deve-se considerar que tal avanço no conhecimento de mecanismo supera qualquer outra possibilidade de delineamento de ensaio, inclusive *in vivo*, e será fundamental como modelo de avaliação de biomateriais, nanoestruturados ou não, assim como fármacos, medicamentos, entre outros itens.

5.4. Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico é um teste de sobrevivência celular *in vitro* baseado na capacidade de células crescerem em colônias. O ensaio essencialmente testa cada

célula da população quanto a sua capacidade de submeter-se a divisão ilimitada. O teste detecta todas as células que mantiveram a capacidade para produzir um vasto número de células após submetidas a tratamento que poderia causar morte reprodutiva, como resultado de dano ao cromossomo, apoptose, etc. (FRANKEN et al., 2006).

A Figura 28 ilustra o aspecto das placas contendo as células incubadas durante 14 dias com diferentes concentrações de nanopartícula de polibutílcianoacrilato e que em seguida, foram coradas pelo cristal violeta. As células de melanoma apresentam melhor visualização, pois tem a característica de crescer em colônias. Os fibroblastos tendem a crescer espalhando-se pela placa e assim, a visualização não foi ideal. A partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, já não foi possível visualizar as colônias, indicando que essas concentrações são tóxicas ao longo do tempo. Esta característica foi também observada com 7 dias de incubação. Embora as concentrações de (10-50) $\mu\text{g/mL}$ não apresentem citotoxicidade ao longo de 72 horas (dados de viabilidade celular pelo Teste de Azul de Tripán), neste caso, após 7 e 14 dias demonstraram ser citotóxicas, comprometendo a capacidade das células se reproduzirem para formar colônias, e levando a sua morte.

Figura 28: Fotografias das placas P100 com células de fibroblasto e melanoma incubadas durante 14 dias com diferentes concentrações ((10-50) $\mu\text{g/mL}$) de nanopartículas de polibutílcianoacrilato e a indicação do número de colônias, conforme o caso.

6. Conclusões

- Foi possível a obtenção, esterilização e caracterização de nanopartículas poliméricas, em particular, de polibutilcianoacrilato, para realização dos ensaios planejados;
- O desenvolvimento de culturas celulares em estrutura tridimensional, visando simular sistemas de avaliação quanto à biocompatibilidade *in vitro* de materiais poliméricos foi realizado, demonstrando ser adequado para o teste na avaliação de citotoxicidade de nanopartículas poliméricas, especificamente de polibutilcianoacrilato;
- Os resultados obtidos em ambiente tridimensional comparados aos obtidos em monocamada indicam diferenças nas respostas das células diante do efeito citotóxico das nanopartículas de polibutilcianoacrilato (menor citotoxicidade, alteração do perfil de proliferação e do mecanismo de autofagia em cada ambiente).

7. Referências Bibliográficas

- ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S., FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliver Rev* 2006, 58: 1688-1713.
- ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L., FAROKHZAD, O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 2008, 5(4): 505-515.
- AMERICAN NATIONAL STANDARD/ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. *ANSI/AAMI ST72:2002: Bacterial endotoxins – Test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing*. Arlington: AAMI, 2002.
- ANDERSON, J.M. Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials. In: ATALA, A., LANZA, R., THOMSON, J., NEREM, R. *Principles of regenerative medicine*. Burlington: Academic Press, 2008.
- ASTM document F, *Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices*, 1983.
- AZEVEDO, J.C. de, CRUZ, A.S., PINTO, T.J.A. Avaliação da biocompatibilidade de implantes mamários de silicone esterilizados por calor seco e pelo óxido de etileno. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2006, 42(2): 259-263.
- BASU, B., NATH, S. Fundamentals of Biomaterials and Biocompatibility. In: BASU, B., KATTI, D.S., KUMAR, A. *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.
- BAATOUT, S., DERRADJI, H. Cytometric methods to analyze radiation effects. *J Biol Reg Homeos Ag* 2004, 18(2): 101-105.
- BELL, E., IVARSSON, B., MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *P Natl Acad Sci USA* 1979, 76(3): 1274-1278.

- BENYA, P.D., SHAFFER, J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982, 30:215-24.
- BERRIDGE, M.V., TAN, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993, 303(2): 474-482.
- BLACK, J. *Biological Performance of Materials*, 2.Ed. New York: M. Dekker, Inc., 1992.
- BOGGIO, R.F., FREITAS, V.M., PAGGIARO, A.O., HERSON, M.R., FERREIRA, M.C., MACHADO-SANTELLI, G.M. Estudo *in vitro* dos efeitos do bloqueador do canal de cálcio (verapamil) sobre a biossíntese e contração da matriz extracelular. *Rev Bras Cir Plást* 2009; 24(1): 91-5.
- BOKHARI, M., CARNACHAN, R.J., CAMERON, N.R., PRZYBORSKI, S.A. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J Anat* 2007, 211: 567-576.
- BORETOS, J.W., EDEN, M. *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects*. Noyes Publications: Park Ridge, NJ, 1984.
- BRASH, J.L. Exploiting the current paradigm of blood-material interactions for the rational design of blood-compatible materials. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000, 11: 1135-1146.
- BRUCK, S.D. *Properties of Biomaterials in the Physiological Environment*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980.
- BRUNER, L.H., CARR, G.J., CHAMBERLAIN, M., CURREN, R.D. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing. *Toxicol In Vitro*. 1996, 10: 479-501.
- BRUNER, L.H., CARR, G.J., CURREN, R.D., CHAMBERLAIN, M. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing. *Environ Health Persp* 1998, 106(2): 477-484.

- BRZOSKA, M., LANGER, K., COESTER, C., LOITSCH, S., WAGNER, T.O.F., MALLINCKRODT, C.V. Incorporation of biodegradable nanoparticle into human airway epithelium cells – in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochem Bioph Res Co* 2004, 318: 562-570.
- CALVO, P., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J Pharm Sci* 1996, 85(5): 530-536.
- CANNAS, M., MASSE, A. PIGATTO, A. Evaluation of Biocompatibility Using Cell Culture Assay: Notes. In: WISE, D.L., TRANTOLO, D.J., ALTOBELLI, D.E., YASZEMSKI, M.J., GRESSER, J.D., SCHWARTZ, E.R. (eds). *Encyclopedic handbook of Biomaterials and Bioengineering. Vol. 1. Part A: Materials*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.
- CIAPETTI, G., CENNI, E., PRATELLI, L. PIZZOFERRATO, A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993, 14(5): 359-364.
- CHIELLINI, F. Perspectives on: *In Vitro* Evaluation of Biomedical Polymers. *J Bioact Compat Pol* 2006, 21: 257-271.
- COUVREUR, P., KANTE, B., ROLAND, M., GUIOT, P., BAUDUIN, P., SPEISER, P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sortptive properties. *J Pharm Pharmacol* 1979, 31: 331-332.
- COUVREUR, P., ROLAND, M., SPEISER, P. Biodegradable submicroscopic particles containing a biologically active substance and compositions containing them. 1982 U.S. Patent 4,329,332.
- COUVREUR, P., VAUTHIER, C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. *J Control Release* 1991, 17: 187-198.
- CROWNINSHIELD, R. An overview of prosthetic materials for fixation. *Clin Orthop Relat R* 1988, 235: 166-172.
- CUKIERMAN, E., PANKOV, R., STEVENS, D.R., YAMADA, K. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001, 294: 1708-1712.

- DABBAH, R. PORTER, D.A. Microbiology of sterilization Processes. In: AGALLOCO, J., CARLETON, F.J. *Validation of Pharmaceutical Process*, 3rd Edition. New York: Informa Healthcare, 2007.
- DEKKER, A. Quantitative Methods for *In Vitro* Cytotoxicity Testing of Biomaterials. *Cell Mater* 1994, 4: 101.
- DOHERTY, P. Inflammation, Carcinogenicity and Hypersensitivity. In: NARAYAN, R. *Biomedical Materials*. New York: Springer, 2009.
- DOSSI, M., STORTI, G., MOSCATELLI, D. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylates) as biodegradable polymers for drug delivery applications. *Macromol Symp* 2010, 289: 124-128.
- EHRLICH, H.P. Wound closure: Evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 1988, 2: 149-157.
- FANG, C., SUI, B., PEI, Y., HONG, M., WU, J., CHEN, H. In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur J Pharm Sci* 2006, 27: 27-36.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5^a edição – Volume 1. Brasília: ANVISA, 2010.
- FAROKHZAD, O.C., LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliver Rev* 2006, 58: 1456-1459.
- FERRANTI, V., MARCHAIS, H., CHABENAT, C., ORECCHIONI, A.M., LAFONT, O. Primidone-loaded poli- ϵ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *Int J Pharm* 1999, 193: 107-111.
- FERNANDEZ-URRUSUNO, R., FATTAL, E., PORQUET, D., FEGER, J., COUVREUR, P. Evaluation of liver toxicological effects induced by polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Toxicol Appl Pharm* 1995, 130: 272-279.
- FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J Ph., AMMOURY, N., BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989, 55: R1-R4.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guideline on validation of *lymulus* amebocyte test as an and-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Rockville, 1987.
- FRANKEN, N., RODERMOND, H.M., STAP, J., HAVEMAN, J., BREE, C. van. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols* 2006, 1(5): 2315-2319.
- FULEKAR, M.H. *Nanotechnology: Importance and Applications*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt, 2010.
- GEBELEIN, C.G., KOBLITZ, F.F. *Biomedical and Dental Applications of Polymers*. New York: Plenum Press, 1981.
- GIPPS, E.M., GROSCURTH, P., KREUTER, J., SPEISER, P.P. The effects of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles on human normal and malignant mesenchymal cells *in vitro*. *Int J Pharm* 1987, 40: 23-31.
- GIVAN, A.L. *Flow cytometry: first principles. 2nd edition*. New York: Willey-Liss, 2001.
- GOLDBERG, A.M., The use of animal cells for evaluation of toxicity, carcinogenesis and mutagenesis. In: SPIER, R.E., GRIFFITHS, J.B. (eds). *Modern Approaches to Animal Cell Technology*. Butterworths, 1987.
- GRECO, R.S., PRINZ, F.B., SMITH, R.L. *Nanoscale Technology in Biological Systems*. Londres: CRC Press, 2005.
- GRIFFITH, L.G. Polymeric Biomaterials. *Acta Mater* 2000, 48: 263-277.
- HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60: 1638–1649.
- HASADSRI, L., KREUTER, J., HATTORI, H., IWASAKI, T., GEORGE, J.M. Functional protein delivery into neurons using polymeric nanoparticles. *J Biol Chem* 2009, 284(11): 6972-6981.

- HELMUS, M.N., TWEDEN, K. *Materials Selection*, In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, vol 1, 1995, 27-59.
- HELMUS, M.N., GIBBONS, D.F., CEBON, D. Biocompatibility: Meeting Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicol Pathol* 2008, 36: 70-80.
- HENCH, L.L., ERTHRIDGE, E.C. *Biomaterials – An Interfacial Approach*, Vol.4, A. Noordergraaf, Ed. New York: Academic Press, 1982.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993: *Biological evaluation of medical devices* Part 1: Evaluation and testing. Geneva: ISO, 2003.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993: *Biological evaluation of medical devices* Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: ISO, 2003.
- JAIN, J.P., YENET, W., DOMB, A.J., KUMAR, N. Biodegradable Polymers in Drug Delivery. In: DOMB, A.J., KUMAR, N., EZRA, A. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.
- JONES, C.F., GRAINGER, D.W. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliver Rev* 2009, 61: 438-456.
- KANE, R.S., STROOCK, A.D. Nanobiotechnology: protein-nanomaterial interactions. *Biotechnol Prog* 2007, 23:316-319.
- KANTE, B., COUVREUR, P., DUBOIS-KRACK, G., DE MEESTER, C., GUIOT, P., ROLAND, M., MERCIER, M., SPEISER, P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticle I: free nanoparticles. *J Pharm Sci* 1982, 71(7): 786-792.
- KARKARE, M. *Nanotechnology: Fundamentals and Applications*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt, 2008.
- KIM, J.S., YOON, T-J., YU, K.N., KIM, B.G., PARK, S.J., KIM, H.W., LEE, K.H., PARK, S.B., LEE, J-K., CHO, M.H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* 2006, 89(1): 338-347.

- KIRKPATRICK, C.J., MITTERMAYER, C. Theoretical and practical aspects of testing potencial biomaterials *in vitro*. *J Mater Sci-Mater M* 1990, 1: 9-13.
- KIRKPATRICK, C.J., BITTINGER, F., WAGNER, M., KOHLER, H., van KOOTEN, T.G., KLEIN, C.L., OTTO, M. Current Trends in Biocompatibility Testing. *P I Mech Eng* 1998, 20: 75–84.
- KROLL, A., PILLUKAT, M.H., HAHN, D., SCNEKENBURGER, J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 2009, 72: 370-377.
- LEE, J., CUDDIHY, M.J., KOTOV, N.A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B* 2008, 14(1): 61-86.
- LEE, J., LILLY, D., DOTY, R.C., PODSIADLO, P., KOTOV, N.A. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small* 2009, 5(10): 1213-1221.
- LEGGAT, P.A., SMITH, D.R., KEDJARUNE, U. Surgical applications of cyanoacrylate adhesives: a review of toxicity. *ANZ J Surg* 2007, 77: 209-213.
- LEWINSKI, N., COLVIN, V., DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008, 4(1): 26-49.
- LHERM, C., MÜLLER, R.H., PUISIEUX, F., COUVREUR, P. Alkylcyanoacrylate drug carriers: II. Cytotoxicity of cyanoacrylate nanoparticles with different alkyl chain length. *Int J Pharm* 1992, 84: 13-22.
- LOCKMAN, P.R., MUMPER, R.J., KHAN, M.A., ALLEN, D.D. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* 2002, 28(1): 1-13.
- MAGREZ, A., KASAS, S., SALICIO, V., PASQUIER, N., SEO, J.W., CELIO, M., CATSICAS, S., SCHWALLER, B., FORRO, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett* 2006, 6(6):1121-1125.
- MAKSIMENKO, O., PAVLOV, E., TOUSHOV, E., MOLIN, A., STUKALOV, Y., PRUDSKOVA, T., FELDMAN, V., KREUTER, J., GELPERINA, S. Radiation

sterilization of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 2008, 356: 325-332.

MASSARO, R.R. *Efeito do 4-nerolidilcatecol na citotoxicidade e inibição de invasões linhagens de glioma humano A172 e T98G*. São Paulo, 2009. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

MILLEROT-SERRUOT, E., GUILBERT, M., FOURRÉ, N., WITKOWSKI, W., SAID, G., VAN GULICK, L., TERRY, C., ZAHM, J., GARNOTEL, R., JEANNESSON, P. 3D collagen type I matrix inhibits the antimigratory effect of doxorubicin *Cancer cell international* 2010, 10(26): 1-9.

MOROZ, A., BITTENCOURT, R.A.C., FELISBINO, S.L., PEREIRA, H.R., ROSSI-FERREIRA, R., DEFFUNE, E. Gel de plaquetas: arcabouço 3D para cultura celular. *Acta Ortop Bras*. 2009, 17(2): 43-5.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65: 55-63.

MOSQUEIRA, V.C.F., LEGRAND, P., PINTO-ALPHANDARY, H., PUISIEUX, F., BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *J Pharm Sci* 2000, 89 (5): 614-626.

MURTHY, R.S.R., PATHAK, Y. In Vitro Blood Interaction and Pharmacological and Toxicological Characterization of Nanosystems. In: PATHAK, Y., THASSU, D. *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. New York: Informa Healthcare, 2009.

NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007, 32: 762-798.

NOGAROTO, S.L., PENHA, T.C.V. *Desinfecção e Esterilização*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2006.

PARK, J.B., LAKES, R.S. *Biomaterials: an introduction*. 3rd. ed. New York: Springer, 2007.

- PEPPAS, N.A., LANGER, R. New Challenges in Biomaterials. *Science* 1994, 263: 1715-1720.
- PETERSEN, M.C., LAZAR, J., JACOB, H.J., WAKATSUKI, T. Tissue engineering: a new frontier in physiological genomics. *Physiol Genomics*. 2007, 32: 28–32.
- PETRI, B., BOOTZ, A., KHALANSKY, A., HEKMATARA, T., MÜLLER, R., UHL, R., KREUTER, J., GELPERINA, S. Chemotherapy of brain tumor using doxorubicin bound surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. *J Control Release* 2007, 117: 51-58.
- PIERSMA, A.H. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. *Toxicol Lett* 2004, 149: 147-153.
- PISANIC II, T.R., BLACKWELL, J.D., SHUBAYEV, V.I., FIÑONES, R.R., JIN, S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 2007, 28(16): 2572-2580.
- PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., PINTO, A.F. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 3ª edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2010.
- PINTO, T.J.A. *Controle de Qualidade de Produtos Médico-Hospitalares: Característica de Biocompatibilidade em Materiais Poliméricos*. São Paulo, 1984. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- PIZZOFERRATO, A., CIAPETTI, G., STEA, S., CENNI, E., ARCIOLA, C.R., GRANCHI, D., SAVARINO, L. Cell Culture Methods for Testing Biocompatibility. *Clin Mater* 1994, 15: 173–190.
- PLATT, D.K. *Biodegradable polymers: market report*. Shrewsbury: Smithers Rapra Limited, 2006.
- RANGASAMY, M. Nano Technology: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011, 1(02): 08-16.

- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2. ed. Boston: Elsevier, 2004.
- RICKERT, D., LENDLEIN, A., PETERS, I., MOSES, M.A., FRANKE, R. Biocompatibility testing of novel multifunctional polymeric biomaterials for tissue engineering applications in head and neck surgery: an overview. *Eur Arch Oto-rhino-l* 2006, 263: 215-222.
- ŘÍHOVÁ, B. Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Adv Drug Deliver Rev* 1996, 21: 157-176.
- ROGERO, S.O., MALMONGE, S.M., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I., MIYAMARU, L., CRUZ, A.S. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials. *Artif Organs* 2003, 27(5): 424-427.
- ROGERS, W. *Sterilisation of Polymer Healthcare Products*. Shrewsbury: Rapra Technology Limited, 2005.
- RUBINSZTEIN, D.C., GESTWICKI, J.E., MURPHY, L.O., KLIONSKY, D.J. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6(4):304-312.
- SAHOO, S.K., LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today* 2003, 8:1112–1120.
- SANTOS, M.T. dos. *Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico*. São Paulo, 2011. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- SAYES, C.M., FORTNER, J.D., GUO, W., LYON, D., BOYD, A.M., AUSMAN, K.D., TAO, Y.J., SITHARAMAN, B., WILSON, L.J., HUGHES, J.B., WEST, J.L., COLVIN, V.L., The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett* 2004, 4(10): 1881-1887.
- SAYES, C.M., MARCHIONE, A.A., REED, K.L., WARHEIT, D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: Few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett* 2007, 7(8): 2399-2406.

- SCHAFFAZICK, S.R., POHLMANN, A.R., FREITAS, L.L., GUTERRES, S.S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm Bonaerense* 2002, 21(2): 99-106.
- SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L., POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Química Nova* 2003, 26(5): 726-737.
- SHAPIRA, A., LIVNEY, Y.D., BROXTERMAN, H.J., ASSARAF, Y.G. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Update* 2011, 14:150-163.
- SHOSEYOV, O., LEVY, I. *NanoBioTechnology: bioinspired devices and materials of the future*. New Jersey: Humana Press, 2008.
- SILVA, G.A., MARQUES, A.P., GOMES, M.E., COUTINHO, O.P., REIS, R.L. Cytotoxicity Screening of Biodegradable Polymeric Systems. In: REIS, R.L., SAN ROMAN, J. (eds) *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.
- SINHA, V.R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 2004, 278: 1-23.
- SOMMERFELD, P., SCHROEDER, U., SABEL, B.A. Sterilization of unloaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm* 1998, 164: 113-118.
- SOMMERFELD, P., SABEL, B.A., SCHROEDER, U. Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions. *J Microencapsul* 2000, 17(1): 69-79.
- SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001, 70: 1-20.
- SPECTOR, M., CEASE, C., TONG-LI, X. The local tissue response to biomaterials. *Crit Rev Biocompat* 1989, 15(3): 269-295.

- SUN, T., JACKSON, S., HAYCOCK, J.W., MACNEIL, S., Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol* 2006, 122: 372-381.
- TSANG, V.L., BHATIA, S.N. Fabrication of three-dimensional tissues. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2006, 103:189-205.
- UNITED States Pharmacopeia. 34.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.
- VAUTHIER, C., DUBERNET, C., FATTAL, E., PINTO-ALPHANDARY, H., COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev* 2003a, 55: 519-548.
- VAUTHIER, C., DUBERNET, C., CHAUVIERRE, C., BRIGGER, I., COUVREUR, P. Drug delivery to resistant tumors the potencial of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release* 2003b, 93: 151-160.
- VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceut Res* 2009, 26(5): 1025-1058.
- VILELA, M.J., MARTINS, M.L., MENDES, R.L., SANTOS, A.A. dos. Determinação de Padrões de Crescimento de células em cultura. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003, 39(1): 67-72.
- WANG, Y., ROBERTSON, J.L., SPILLMAN Jr., W.B., CLAUS, R.O. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharmaceut Res* 2004, 21(8): 1362-1373.
- WILLIAMS, D.F. *Definition in biomaterials*. In: *Progress in Biomedical Engineering*. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 67
- WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008, 29: 2941–2953.
- WITTE, R.P., KAO, W.J. Keratinocyte-fibroblast paracrine interaction: the effects of substrate and culture condition. *Biomaterials* 2005, 26: 3673-3682.

WONG, J.Y., BRONZINO, J.D. *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press, 2007.

ZHANG, Y., ZHANG, Y., CHEN, J., ZHANG, B., PAN, Y., REN, L., ZHAO, J., LUO, Y., ZHAI, D., WANG, S., WANG, J. Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as novel vectors in cancer gene therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2007a, 3: 144-153.

ZHANG, Y., CHEN, W., ZHANG, J., LIU, J., CHEN, G., POPE, C. In Vitro and In Vivo Toxicity of CdTe Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2007b, 7: 497-503.

ZHANG, Y., ZHU, S., YIN, L., QIAN, F., TANG, C., YIN, C. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. *Eur Polym J* 2008, 44: 1654-1661.

ANEXO I
Tabela de Seleção de Testes para Dispositivos de Superfície
 Farmacopéia Brasileira 5ª edição Volume 1, 2010, pg. 309

<i>Categorias de Correlatos</i>		<i>Efeito Biológico^a</i>											
<i>Contato com o Corpo</i>	<i>Duração do Contato^b</i>	<i>Citotoxicidade</i>	<i>Sensibilização</i>	<i>Irritação ou Reatividade Intracutânea</i>	<i>Toxicidade Sistêmica (Aguda)</i>	<i>Toxicidade Subcrônica (Subaguda)</i>	<i>Genotoxicidade</i>	<i>Implantação</i>	<i>Hemocompatibilidade</i>	<i>Toxicidade Crônica</i>	<i>Carcinogenicidade</i>	<i>Toxicidade Reprodutiva ou de Desenvolvimento</i>	<i>Biodegradação</i>
Dispositivos de Superfície	Pele	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Mucosa	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Superfícies Comprometidas ou Não-Íntegras	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

^a Legenda A: limitada (menos de 24 horas); B: prolongada (de 24 horas a 30 dias); C: permanente (mais de 30 dias).

^b Legenda X: Testes de avaliação ISO para consideração; O: testes adicionais que podem ser aplicados.

• Adaptado do FDA's *Blue Book Memorandum #G95-1* (Tabela 1. Testes de Avaliação Inicial para Consideração e Tabela 2. Testes de Avaliação Complementar para Consideração).

ANEXO II

Tabela de Seleção de Testes para Dispositivos de Comunicação Extracorpórea
Farmacopéia Brasileira 5ª edição Volume 1, 2010, pg. 310

Categorias de Correlatos			Efeito Biológico ^b											
Contato com o Corpo	Duração do Contato *	Citotoxicidade	Sensibilização	Irritação ou Reatividade Intracelular	Toxicidade Sistêmica (Aguda)	Toxicidade Subcrônica (Subaguda)	Genotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade	Toxicidade Crônica	Carcinogenicidade	Toxicidade Reprodutiva ou de Desenvolvimento	Biodegradação	
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

^a Legenda A: limitada (menos de 24 horas); B: prolongada (de 24 horas a 30 dias); C: permanente (mais de 30 dias).

^b Legenda X: Testes de avaliação ISO para consideração; O: testes adicionais que podem ser aplicados.

* Adaptado do FDA's Blue Book Memorandum #G95-1 (Tabela 1. Testes de Avaliação Inicial para Consideração e Tabela 2. Testes de Avaliação Complementar para Consideração).

ANEXO III
Tabela de Seleção de Testes para Dispositivos Implantáveis
 Farmacopéia Brasileira 5ª edição Volume 1, 2010, pg. 311

Categorias de Correlatos	Efeito Biológico ^b													
	Duração do Contato ^a	Citotoxicidade	Sensibilização	Irritação ou Reatividade Intracelular	Toxicidade Sistêmica (Aguda)	Toxicidade Subcrônica (Subaguda)	Genotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade	Toxicidade Crônica	Carcinogenicidade	Toxicidade Reprodutiva ou de Desenvolvimento	Biodegradação	
Contato com o Corpo	Tecido ou Osso	A	X	X	X	O	O	O	—	—	—	—	—	—
		B	X	X	O	O	O	X	X	—	—	—	—	—
		C	X	X	O	O	O	X	X	—	X	X	—	—
	Sangue	A	X	X	X	X	—	X	X	X	—	—	—	—
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	—	—	—	—
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	—	—

^a Legenda A: limitada (menos de 24 horas); B: prolongada (de 24 horas a 30 dias); C: permanente (mais de 30 dias).

^b Legenda X: Testes de avaliação ISO para consideração; O: testes adicionais que podem ser aplicados.

* Adaptado do FDA's *Blue Book Memorandum #295-1* (Tabela 1. Testes de Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos—Parte 1: Avaliação e Testes).

1 Documento da ISO 10993-1:1997 intitulado *Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing*. [Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos—Parte 1: Avaliação e Testes].

* Adaptado do FDA's *Blue Book Memorandum #295-1* ("Use of International Standard ISO-10993: 'Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing'") ("Uso das Normas Internacionais da ISO-10993: 'Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos—Parte 1: Avaliação e Testes'").