

Sandra Marina de Almeida Santos

ESTUDOS TOXICOLÓGICOS DE MATERIAIS NANO-ESTRUTURADOS DE CARBONO. ALGUMAS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Tese de Doutoramento na área científica de Bioquímica, especialidade de Toxicologia Bioquímica, orientada pela Professora Doutora Maria Amália da Silva Jurado e coorientada pelo Professor Doutor Romeu António Videira e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudos Toxicológicos de Materiais Nano-Estruturados de Carbono. Algumas Aplicações Farmacológicas

Sandra Marina de Almeida Santos

Tese apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para prestação de provas de Doutoramento em Bioquímica, especialidade de Toxicologia Bioquímica, sob a supervisão da Professora Doutora Maria Amália da Silva Jurado (Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Romeu António Videira (Departamento de Química da Escola da Ciência da Vida e do Ambiente da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro).

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ilustração da capa:

Localização dos fulerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ numa bicamada lipídica. Ilustração produzida por Romeu A. Videira.

Este trabalho foi realizado no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e no CECAV, Departamento de Química da Escola da Ciência da Vida e do Ambiente da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro sob a supervisão da Professora Doutora Maria Amália da Silva Jurado e do Professor Doutor Romeu António Videira.

Este trabalho foi financiado por fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos projetos PTDC/QUI-BIQ/103001/2008 e Pest-C/SAU/LA0001/2011 e da bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/35285/2007) atribuída ao autor do trabalho.



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Amália da Silva Jurado e ao Professor Doutor Romeu António Videira, desejo manifestar os meus mais sinceros agradecimentos. A orientação científica, os seus ensinamentos, a disponibilidade permanente, o estímulo, a motivação e a dedicação com que sempre acompanharam o desenvolvimento deste trabalho, foram determinantes para a sua concretização. Agradeço-lhes ainda as sugestões e a revisão crítica imprescindíveis à elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Maria da Conceição Monteiro Pedroso de Lima desejo expressar o meu agradecimento pelo incansável apoio prestado na área da terapia génica e pelo incentivo e disponibilidade sempre demonstrada durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, manifesto o meu reconhecimento por me ter permitido realizar este trabalho no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Ao Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Professor Doutor Francisco Peixoto agradeço a possibilidade que me foi concedida para realizar parte deste trabalho nesta instituição.

Ao Professor Doutor Augusto Manuel Ferreira Dinis manifesto o meu agradecimento pelo apoio prestado na área da microscopia eletrónica, imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Doutor Lino Ferreira agradeço o acesso à utilização do equipamento para a determinação do tamanho e do potencial Zeta das suspensões aquosas dos nanomateriais utilizadas neste trabalho.

Ao Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca agradeço os conhecimentos científicos que prontamente me transmitiu na área da terapia génica (componente laboratorial).

À Doutora Maria Augusta, à Doutora Sancha Santos e ao Dr. Manuel Joaquim Matos agradeço o apoio, a motivação e os preciosos conhecimentos científicos que me transmitiram.

Aos colegas com quem partilhei os Laboratórios do Departamento de Zoologia e os Laboratórios da Faculdade de Medicina agradeço o apoio, a motivação e a amizade sempre demonstrada ao longo deste trabalho. À Ana Luísa Cardoso agradeço as suas sugestões no âmbito da terapia génica e a sua disponibilidade permanente. Um agradecimento muito

especial à Catarina Morais pelas suas sugestões e pelo incansável apoio laboratorial, disponibilidade permanente, amizade e espírito de camaradagem imprescindíveis à realização deste trabalho. À Dina Farinha, Ana Cardoso, Ana Maria Silva, Carolina Moreira, Susana Pereira, Cláudia Pereira e Paula Mota agradeço a motivação e a amizade demonstrada ao longo deste trabalho.

Desejo também expressar o meu reconhecimento ao pessoal auxiliar e técnico dos Laboratórios do Departamento de Zoologia e da Faculdade de Medicina que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus Pais e ao meu marido agradeço todo o carinho, apoio e motivação demonstrado durante mais esta caminhada.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia agradeço a bolsa de Doutoramento que me foi concedida (SFRH/BD/35285/2007) e que permitiu a realização deste trabalho.

À minha filha

Publicações resultantes do trabalho efetuado no âmbito desta Tese:

Sandra M. A. Santos, Augusto M. Dinis, David M. F. Rodrigues, Francisco Peixoto, Romeu A. Videira, Amália S. Jurado (2013). Studies on the toxicity of an aqueous suspension of C₆₀ nanoparticles using a bacterium (*gen. Bacillus*) and an aquatic plant (*Lemna gibba*) as *in vitro* model systems. *Aquatic Toxicology*. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.09.001

Sandra M. A. Santos, Francisco Peixoto, Lino Ferreira, Amália S. Jurado, Romeu A. Videira (2013). Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics. *Toxicological Sciences* (aceite com *minor revisions*)

Sandra M. A. Santos, Romeu A. Videira, Maria A. S. Fernandes, Maria S. Santos, António J. M. Moreno, Joaquim A. F. Vicente, Amália S. Jurado (2013). Toxicity of the herbicide linuron as assessed by bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicology in Vitro* (submetido)

Susana P. Pereira, Sandra M. A. Santos, Maria A. S. Fernandes, João D. Martins, António J. Moreno, Maria C. Pedroso de Lima, Joaquim A. F. Vicente, Romeu A. Videira, Amália S. Jurado (2013). Toxicity assessment of the herbicide alachlor using *in vitro* bacterial, animal and plant model systems. *Toxicology* (submetido)

Sandra M. A. Santos, Catarina M. Morais, Ana L. Cardoso, Francisco Peixoto, Maria C. Pedroso de Lima, Romeu A. Videira, Amália S. Jurado. Interaction of the fullerenes C₆₀ and C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ with cells and biological membranes: from cytotoxicity to antioxidant properties and siRNA delivery (em preparação).

Outras publicações:

Amália S. Jurado, Catarina M. Morais, Sandra M. Santos, Romeu A. Videira, Maria C. Pedroso de Lima (2013). The role of membrane lipids in a toxicological context: Lessons from microorganism adaptive responses. In: A Toxicological/Pharmacological Approach to Chemico-Biological Interactions at a Membrane Level. A. S. Jurado, ed., Research Signpost. Transworld Research Network. ISSN/ISBN: 978-81-308-0494-1

Índice

ABREVIATURAS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
Capítulo 1 - Introdução Geral	7
1.1 A nanotecnologia e os nanomateriais	9
1.1.1 Nanomateriais de carbono – os fulerenos	12
1.2 Toxicologia dos nanomateriais	16
1.3 Os nanomateriais e as suas aplicações de interesse farmacológico	24
1.3.1 Os nanomateriais como reguladores do equilíbrio oxido-redutor da célula	24
1.3.2 Os nanomateriais como vetores para a entrega de fármacos.....	28
1.3.2.1 Os nanomateriais como vetores para a entrega de ácidos nucleicos e as suas potencialidades na terapia génica	30
1.4 Objetivos do trabalho.....	36
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	39
2.1 Reagentes	41
2.2 Preparação de suspensões aquosas de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	41
2.3 Caracterização das suspensões aquosas de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ : dimensões e carga superficial.....	43
2.4 Avaliação do efeito dos fulerenos na bioenergética mitocondrial	43
2.4.1 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato.....	43
2.4.2 Determinação da concentração de proteína.....	44
2.4.3 Avaliação da atividade respiratória das mitocôndrias.....	45
2.4.4 Determinação do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) da mitocôndria	46
2.4.5 Avaliação da atividade da F ₀ F ₁ -ATPase	47
2.5 Estudos de fluorescência: Determinação da localização e da partilha dos fulerenos nas membranas.....	48
2.5.1 Preparação de lipossomas unilamelares de DPPC	48
2.5.2 Preparação e incorporação das sondas nas membranas	49
2.5.3 Determinação da localização e da partilha dos fulerenos nas membranas por fluorescência	50
2.6 Avaliação do efeito dos fulerenos na oxidação lipídica de membranas mitocondriais induzida por <i>t</i> -butil-hidroperóxido	52
2.7 Avaliação dos efeitos dos fulerenos na bactéria <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ... 53	
2.7.1 Cultura de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> e preparação dos protoplastos	53

2.7.2	Avaliação do crescimento de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	55
2.7.3	Caracterização morfológica das células de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ...	56
2.7.4	Avaliação da atividade respiratória dos protoplastos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	57
2.8	Avaliação dos efeitos dos fulerenos na planta <i>Lemna gibba</i>	58
2.8.1	Cultura de <i>Lemna gibba</i> e isolamento de cloroplastos.....	58
2.8.2	Extração e determinação da concentração de clorofilas.....	59
2.8.3	Avaliação do crescimento e do conteúdo em clorofilas da <i>Lemna gibba</i>	59
2.8.4	Avaliação da atividade fotossintética da <i>Lemna gibba</i>	60
2.9	Avaliação da toxicidade dos fulerenos em células animais	62
2.9.1	Culturas primárias de astrócitos	62
2.9.2	Cultura de linhas celulares	63
2.9.3	Exposição das células aos fulerenos e determinação da viabilidade celular.....	63
2.10	Avaliação do efeito protetor dos fulerenos no stresse oxidativo induzido por <i>t</i> -butil-hidroperóxido em células em cultura	64
2.11	Avaliação da expressão e do silenciamento da proteína GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>) em células em cultura.....	66
2.11.1	Lipossomas e preparação dos complexos.....	66
2.11.2	Avaliação da atividade de transfecção	67
2.11.3	Avaliação da expressão e do silenciamento de GFP pelos complexos por citometria de fluxo	67
2.12	Análise estatística	68
	Capítulo 3 - Resultados	69
3.1	Interação de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ com as biomembranas: da partilha aos efeitos na bioenergética mitocondrial	71
3.1.1	Caracterização das formulações aquosas de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	73
3.1.2	Localização e partilha das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ em membranas biológicas	75
3.1.3	Efeitos das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na bioenergética mitocondrial	83
3.2	O impacto ecológico das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ : Utilização de um microrganismo procariótico (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>) e de um organismo eucariótico (<i>Lemna gibba</i>) como sistemas-modelo para rastreio de ecotoxicidade	95
3.2.1	Caracterização física das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ em suspensão em meios de diferente composição	96

3.2.2 Avaliação da toxicidade das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ num microrganismo procariótico (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	98
3.2.2.1 Efeitos das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ no crescimento de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	98
3.2.2.2 Efeitos das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na atividade respiratória de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	103
3.2.3 Avaliação da toxicidade das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ numa planta aquática (<i>Lemna gibba</i>)	106
3.2.3.1 Efeito das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ no crescimento e no conteúdo em clorofilas de <i>Lemna gibba</i>	106
3.2.3.2 Efeito das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na atividade fotossintética de <i>Lemna gibba</i>	109
3.3 Interação das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ com células animais: da citotoxicidade às suas potenciais aplicações farmacológicas.....	112
3.3.1 Propriedades físico-químicas e citotoxicidade das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	113
3.3.2 Atividade antioxidante das nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	116
3.3.3 As nanopartículas de C ₆₀ como vetores de ácidos nucleicos	123
3.3.3.1 Nanopartículas de C ₆₀ no silenciamento de uma proteína-repórter (GFP) em células animais	124
3.3.3.2 Nanopartículas de C ₆₀ na entrega de pDNA em modelos celulares	132
Capítulo 4 - Discussão	135
Capítulo 5 - Conclusões	165
Bibliografia	169
ANEXOS	193

Índice de Figuras

Figura 1 - Relação de tamanhos entre os nanomateriais (fulereno, C_{60}) e algumas estruturas biológicas.....	10
Figura 2 – Estrutura química do fullereno C_{60}	13
Figura 3 – Estrutura química do $C_{60}(OH)_{18}$	16
Figura 4 – Processo de peroxidação lipídica.....	26
Figura 5 – A mitocôndria produz espécies reativas de oxigénio que podem causar danos celulares	27
Figura 6 – Principais vias de endocitose.....	32
Figura 7 – Barreiras biológicas que têm de ser ultrapassadas para o material genético (DNA) alcançar o núcleo em células-alvo	33
Figura 8 – Registos típicos da distribuição do tamanho das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ em suspensões em água.....	74
Figura 9 – Espectros de emissão das sondas fluorescentes 2-AS e 16-AP incorporadas em membranas de DPPC na ausência e na presença de concentrações de nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$	76
Figura 10 –Variação da supressão de fluorescência das sondas 16-AP e 2-AS incorporadas em membranas de DPPC em função da concentração das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$	77
Figura 11 – Localização dos fullerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ numa bicamada lipídica	78
Figura 12 –Variação da supressão de fluorescência das sondas 16-AP e 2-AS incorporadas em membranas de DPPC em função da concentração das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$	80
Figura 13 –Variação da supressão de fluorescência das sondas 16-AP e 2-AS incorporadas em membranas mitocondriais em função da concentração das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$	81
Figura 14 – Efeito da concentração de nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ no consumo de oxigénio e no índice de controlo respiratório (ICR), usando glutamato/malato (complexo I) e succinato (complexo II) como substratos respiratórios	88
Figura 15 – Registos típicos do potencial eléctrico transmembranar ($\Delta\Psi$)	

de mitocôndrias de fígado de rato na ausência (controlo) e na presença de nanopartículas de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	91
Figura 16 – Efeito das nanopartículas de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na atividade enzimática da F ₀ F ₁ -ATPase de mitocôndrias de fígado de rato	94
Figura 17 – Efeito da concentração de nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ no crescimento de culturas de <i>G. stearothermophilus</i>	100
Figura 18 – Imagens de microscopia eletrónica de transmissão de células de <i>G. stearothermophilus</i>	101
Figura 19 – Efeito da concentração de nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na velocidade de consumo de oxigénio por protoplastos de <i>G. stearothermophilus</i>	105
Figura 20 – Efeito da concentração de nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na taxa relativa de crescimento e no conteúdo em clorofilas da <i>Lemna gibba</i>	108
Figura 21 – Efeito da concentração de nanopartículas de C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na taxa de produção de oxigénio de cloroplastos isolados de <i>Lemna gibba</i>	109
Figura 22 – Efeito da concentração de nanopartículas de C ₆₀ e de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na viabilidade de células HeLa, neuro2a e de astrócitos de rato	115
Figura 23 – Efeito da concentração de <i>t</i> -butil-hidroperóxido na proliferação de células neuro2a.....	117
Figura 24 – Efeito do <i>t</i> -butil-hidroperóxido na proliferação de células neuro2a, na presença de nanopartículas de C ₆₀	119
Figura 25 – Efeitos do <i>t</i> -butil-hidroperóxido na proliferação de células neuro2a, na presença de nanopartículas de C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	120
Figura 26 – Efeitos protetores dos fulerenos C ₆₀ e C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ na oxidação do ácido cis-parinárico (sonda) incorporado em mitocôndrias	122
Figura 27 – Silenciamento de GFP em células HT-1080 mediado por complexos DOTAP:DOPE e C ₆₀ :(DOTAP:DOPE)	126
Figura 28 – Efeito dos complexos DOTAP:DOPE/siRNA e C ₆₀ :(DOTAP:DOPE)/siRNA na viabilidade das células HT-1080.....	127
Figura 29 – Efeito da razão de carga dos complexos DOTAP:DOPE/siRNA e C ₆₀ :(DOTAP:DOPE)/siRNA no silenciamento de GFP em células U87	129

Figura 30 – Efeito da razão de carga dos complexos DOTAP:DOPE e C_{60} :(DOTAP:DOPE) no silenciamento de GFP em células U87	130
Figura 31 – Efeito da razão de carga dos complexos DOTAP:DOPE/siRNA e C_{60} :(DOTAP:DOPE)/siRNA na viabilidade das células U87	131
Figura 32 – Eficiência de transfecção dos complexos (DOTAP:DOPE)/pGFP e C_{60} :(DOTAP:DOPE)/pGFP nas células HeLa	133
Figura 33 - Efeito dos complexos (DOTAP:DOPE)/pGFP e C_{60} :(DOTAP:DOPE)/pGFP na viabilidade das células HeLa	134

Índice de Tabelas

Tabela I - Valores da constante aparente de Stern-Volmer e do coeficiente de partilha para as nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ em membranas de DPPC e de mitocôndrias de fígado de rato.....	82
Tabela II – Efeito da concentração de nanopartículas de C_{60} no potencial elétrico transmembranar de mitocôndrias de fígado de rato.....	92
Tabela III – Efeito da concentração de nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ no potencial elétrico transmembranar de mitocôndrias de fígado de rato.....	93
Tabela IV – Dimensões e potencial Zeta das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ em suspensão em água e em meios de diferente composição.....	97
Tabela V – Dimensões e potencial Zeta das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ em suspensão em água e no meio de cultura celular.....	113

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5'-difosfato
16 –AP	Ácido 16-(9-antioiloxi)-palmítico
2 – AS	Ácido 2-(9-antioiloxi)-esteárico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
Akt	Proteína cinase B
BSA	Albumina sérica bovina
CPP	Peptídeo permeante
DLS	Dispersão Dinâmica de Luz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMRIE	Cloreto de N-(hidroxietil)-N-(2,3-ditetradeciloxipropanol) N, N-dimetilamónio
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamónio-propano
DOTMA	N-(2,3-dioleoiloxipropilo)-N,N,N- cloreto de trimetilamónio
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis [β amino-(éter etílico)]-N,N'-tetracético
FCCP	Carbonildiciano- <i>p</i> -trifluoro-metoxifenil-hidrazona
GFP	Proteína verde fluorescente
Hepes	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
ICR	Índice de controlo respiratório
MLV	Vesículas multilamelares
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
ROS	Espécies reativas de oxigénio

SDS	Dodecilsulfato de sódio
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
tBHP	<i>t</i> -butil-hidroperóxido
TPP ⁺	Ião de tetrafenilfosfônio
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
$\Delta\Psi$	Potencial elétrico transmembranar
$(\Delta\mu_{\text{H}^+})$	Gradiente eletroquímico de prótons

RESUMO

Este trabalho descreve um estudo da interação de suspensões aquosas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ com sistemas biológicos considerando modelos de complexidade crescente, das membranas aos organismos, passando pelos organelos e células. Enquanto a preparação de suspensões aquosas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ foi realizada por dissolução direta em água, tendo dado lugar a nanopartículas com diâmetro inferior a 3 nm e potencial Zeta de cerca de -37 mV, a obtenção de suspensões aquosas de C_{60} obrigou a uma dissolução prévia em tolueno, seguida de transferência para água, produzindo nanopartículas de 33 nm e potencial Zeta de cerca de -25 mV. As características físicas das nanopartículas não sofreram alteração nos meios que mimetizaram as condições fisiológicas dos sistemas biológicos.

Estudos de supressão de fluorescência mostraram que os fulerenos partilham extensivamente tanto em modelos membranares como em membranas nativas e incorporam em regiões distintas da membrana. C_{60} apresenta valores de coeficiente de partilha cerca de 6 vezes superiores aos de $C_{60}(OH)_{18-22}$ e localiza-se preferencialmente no interior hidrofóbico da membrana ao passo que $C_{60}(OH)_{18-22}$ prefere regiões próximas dos grupos polares dos fosfolípidos.

Os efeitos dos fulerenos na atividade do sistema respiratório mitocondrial, tomada como ilustrativa de uma função celular residente na membrana e fortemente influenciada por agentes que interagem com os componentes da membrana e alteram a sua topologia, foram investigados seguindo as flutuações do potencial elétrico transmembranar, a despolarização induzida pelo ADP e o consumo de oxigénio promovido por diferentes substratos. Foi demonstrado que, na mesma gama de concentrações, C_{60} exerce uma toxicidade mitocondrial mais severa do que $C_{60}(OH)_{18-22}$, traduzindo-se por aumento da permeabilidade passiva da membrana interna a protões e inibição da atividade dos complexos respiratórios, sem afetar o sistema fosforilativo. Todavia, $C_{60}(OH)_{18-22}$ a concentrações superiores à máxima utilizada de C_{60} , inibe a atividade da F_0F_1 -ATPsintase.

A um nível de complexidade biológica mais elevado e num contexto de toxicologia ambiental, os efeitos dos fulerenos foram avaliados em dois organismos-modelo: *Geobacillus stearothermophilus* em representação dos microrganismos decompositores e *Lemna gibba* em representação das plantas fotossintéticas. Enquanto o crescimento e a estrutura morfológica da bactéria não foram afetados pelos fulerenos na gama de concentrações de 2 a 15 mg/L (para C_{60}) e de 5 a 200 mg/L (para $C_{60}(OH)_{18-22}$) e a

atividade respiratória dos protoplastos só foi inibida pelo fulereno hidroxilado a concentrações muito elevadas ($\geq 1040 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), a proliferação vegetativa da *L. gibba* foi fortemente reduzida por C_{60} (até $10 \text{ mg}/\text{L}$) e por $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18-22}$ ($\geq 100 \text{ mg}/\text{L}$). Alterações do conteúdo em clorofilas e da atividade fotossintética de *L. gibba*, mais severas na presença de C_{60} do que de $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18-22}$, foram igualmente observadas.

A toxicidade dos fulerenos foi também avaliada utilizando linhas celulares humanas (HeLa, neuro2a) e culturas primárias de astrócitos de rato, não tendo sido detetados efeitos tóxicos a concentrações até $15 \text{ mg}/\text{L}$ para C_{60} e até $100 \text{ mg}/\text{L}$ para $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18-22}$, após 24 e 48 horas de incubação. Estes resultados motivaram a investigação do potencial farmacológico destas nanopartículas. C_{60} , ao contrário do $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18-22}$, mostrou capacidade de proteger as células neuro2a da toxicidade de *t*-butil-hidroperóxido, conhecido por induzir morte celular associada a stresse oxidativo. Já os estudos de peroxidação lipídica em mitocôndrias de fígado de rato mostraram que ambos os fulerenos são capazes de se opor à degradação oxidativa dos lípidos induzida pelo agente oxidante, sendo a proteção conferida por C_{60} significativamente superior à promovida pelo seu congénere hidroxilado. Estes resultados são discutidos à luz das diferenças na localização e extensão da partilha dos fulerenos nas biomembranas.

Numa perspetiva de aplicação farmacológica dos fulerenos a doenças neurodegenerativas, investigou-se a possibilidade do fulereno C_{60} conjugar às suas propriedades antioxidantes a capacidade de funcionar como vetor de ácidos nucleicos, num contexto de terapia génica. C_{60} , embora não tenha permitido, nas condições experimentais ensaiadas, promover a expressão de uma proteína-repórter (GFP) em células HeLa, por transfecção com um plasmídeo de DNA, revelou qualidades assinaláveis como vetor de moléculas de RNA de interferência, induzindo o silenciamento da expressão da proteína GFP em células HT-1080 e U87.

Em conclusão, as propriedades físico-químicas dos fulerenos, influenciando a sua incorporação e topologia nas membranas biológicas, revelaram-se determinantes da atividade toxicológica e do potencial farmacológico daqueles compostos. Especificamente, a ausência de toxicidade em células nervosas, o efeito protetor de danos oxidativos e a capacidade de transportar ácidos nucleicos (siRNA) conferem ao C_{60} elevado potencial neuroprotetor.

Palavras-chave: Fulerenos; Partilha membranar; Bioenergética mitocondrial; Toxicidade; Atividade antioxidante; Entrega de ácidos nucleicos.

ABSTRACT

This work, presents a study on the interaction of fullerene C_{60} and its derivative $C_{60}(OH)_{18-22}$ with biological systems considering models of increasing complexity, from membranes to organisms, encompassing organelles and cells. While aqueous suspensions of $C_{60}(OH)_{18-22}$ were prepared by dissolving the fullerene directly in water, generating nanoparticles with < 3 nm in diameter and -37 mV of Zeta potential, the suspensions of C_{60} in water were obtained by transferring the fullerene from toluene into an aqueous phase, producing nanoparticles with 33 nm in diameter and -25 mV of Zeta potential. These physical characteristics were not altered in media mimicking physiological conditions.

Fluorescence quenching studies showed that fullerenes partition strongly in model and native membranes, incorporating in different regions of lipid bilayer thickness. C_{60} , as compared with $C_{60}(OH)_{18-22}$, exhibit higher values of partition coefficient and partitioned in deeper regions of the lipid bilayer.

The effects of fullerenes on the activity of mitochondrial respiratory system, taken as a cellular function residing in membranes and influenced by agents that interact with membrane components and modify their topology, were investigated by following fluctuations of transmembrane electric potential, ADP-induced depolarization and oxygen consumption supported by different substrates. In the same concentration range, C_{60} exerts higher mitochondrial toxicity as compared with $C_{60}(OH)_{18-22}$, reflected by increased inner mitochondrial membrane permeability to protons and inhibition of respiratory complexes, without affecting the phosphorylation system. However, at higher concentrations, $C_{60}(OH)_{18-22}$ inhibits FoF1-ATP synthase.

At a higher complexity level and in an ecotoxicological context, fullerene effects were studied in two organism models: *Geobacillus stearothermophilus*, as an organism carrying out nutrient recycling, and *Lemna gibba*, as a photosynthetic organism. While bacterial growth and ultrastructure were not affected by fullerenes in the concentration ranges of 2-5 mg/L for C_{60} and 5-200 mg/L for $C_{60}(OH)_{18-22}$, and bacterial protoplast respiratory activity was inhibited by $C_{60}(OH)_{18-22}$ only at very high concentrations (≥ 1040 mg per mg of protein), *L. gibba* growth was significantly reduced by C_{60} (up to 10 mg/L) and $C_{60}(OH)_{18-22}$ (≥ 100 mg/L). Alterations in chlorophyll content and photosynthetic activity of *L. gibba*, more pronounced in the presence of C_{60} than in the presence of $C_{60}(OH)_{18-22}$, were also observed.

Fullerene toxicity was also assessed by using human cell lines (HeLa, neuro2a) and rat astrocyte primary cultures. No significant levels of toxicity were detected in the presence of C₆₀ at concentrations up to 15 mg/L and of C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ up to 100 mg/L, upon 24 and 48 h of incubation.

These results motivated the investigation of fullerene pharmacological potential. C₆₀, as opposed to C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, showed high capacity of protection of neuro2a cells against the toxicity of *t*-butyl hydroperoxide, known as a cell death inducer associated with oxidative stress. However, lipid peroxidation studies on rat liver mitochondrial membranes showed that both fullerenes protect membrane lipids against oxidative degradation, C₆₀ being more efficient than C₆₀(OH)₁₈₋₂₂. These results are discussed taking into account the fullerene partition and membrane localization.

In a perspective of fullerene application in neurodegenerative disease therapy, the possibility of fullerene C₆₀ to conjugate antioxidant properties to the capacity for nucleic acid delivery was explored. Although C₆₀-containing pDNA complexes has not promoted GFP expression in HeLa cells, in the experimental conditions assayed, complexes of siRNA with C₆₀ showed high levels of GFP silencing in HT-1080 and U87 cells.

In conclusion, fullerene physical properties influence their membrane incorporation and localization, hence determining their toxicological activity and pharmacological potential. Specifically, the absence of toxicity of C₆₀ on neuronal cells, the protection afforded by this fullerene against oxidative stress, and its capacity for siRNA delivery make C₆₀ a promising tool for neuroprotection.

Keywords: Fullerenes; Membrane partition; Mitochondrial bioenergetics; Toxicity; Antioxidant activity; Delivery of nucleic acids.

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1A nanotecnologia e os nanomateriais

A produção de materiais e o seu processamento de modo a obter produtos suscetíveis de melhorar a qualidade de vida das populações foi e continua a ser um dos principais desafios científicos e tecnológicos da humanidade. De facto, os avanços progressivos na ciência e na tecnologia dos materiais têm alicerçado o progresso da humanidade desde a idade da pedra até à atualidade. A procura permanente do controlo da natureza associada à descoberta do átomo, à compreensão dos mecanismos subjacentes à organização da matéria à escala atómica e molecular e ao advento do microscópio de túnel de varrimento (STM) permitiram que, no final do século XX, surgisse a nanotecnologia. Com a nanotecnologia ou engenharia à escala última da matéria ordinária, o Homem tem por objetivo dominar e/ou imitar o virtuosismo da natureza na organização da matéria, átomo por átomo, molécula por molécula. A palavra nanotecnologia é um neologismo que agrega o prefixo “nano”, proveniente do grego antigo com o significado de “anão”, à palavra tecnologia. Em termos operacionais, o prefixo “nano” indica que se trata de uma tecnologia para controlar a matéria à escala nanométrica ou, de forma mais inclusiva, desde a escala do átomo até cerca de 100 nm (Hristozov e Malsch, 2009). Em termos de comparação, o raio de um átomo é cerca de um décimo do nanómetro, a espessura de uma membrana biológica é cerca de 5 nm, a maior parte das bactérias apresenta tamanhos superiores a 1000 nm e as células eucarióticas tamanhos da ordem das dezenas de milhar de nanómetros (Fig. 1).

O potencial científico e tecnológico em compreender e modelar as propriedades da matéria a uma escala celular atraiu cientistas de múltiplas áreas (desde as engenharias às biomedicinas passando pela física, química e biologia), conferindo à nanotecnologia um carácter multidisciplinar e transdisciplinar. Este aspeto também despertou o interesse e a curiosidade da população em geral e de inúmeros governos (*e.g.* União Europeia, EUA, Japão, China) que rapidamente alocaram investimentos da ordem dos biliões de dólares em programas específicos de investigação e de desenvolvimento (Aitken et al., 2006). Em consequência, a nanotecnologia molecular e de interfaces, a nanobiotecnologia, a produção de nanodispositivos semicondutores e de materiais nano-estruturados em geral emergiram simultaneamente como áreas de investigação e de atividade económica (Borm et al., 2006). Assim, a nanotecnologia é um fenómeno global e é expectável que seja capaz de promover o bem-estar material e a saúde das pessoas, aumentar a eficiência na utilização de energia e

reduzir o impacto das atividades humanas sobre o planeta, isto é, espera-se que seja o motor do desenvolvimento económico e social do século XXI.

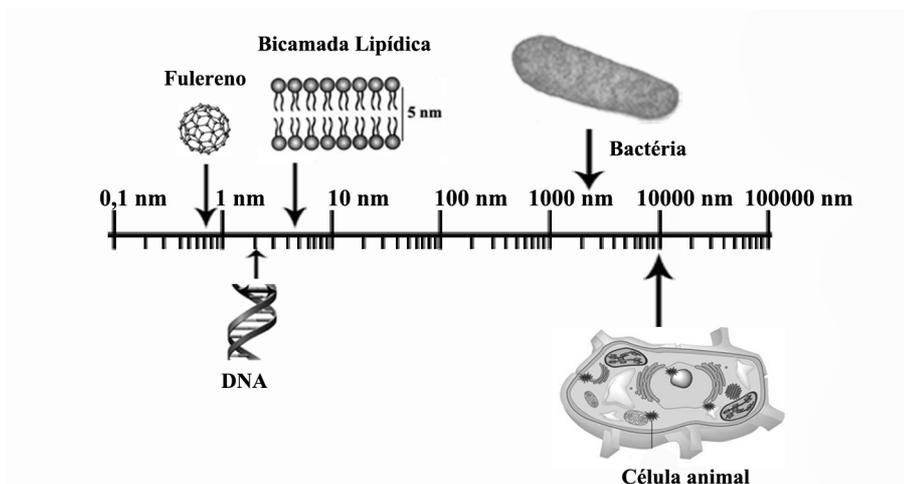


Figura 1 – Relação de tamanhos entre os nanomateriais (fulcreno, C₆₀) e algumas estruturas biológicas.

A nanoprodução de materiais e dispositivos pode ser obtida por processos de tecnologia planar em sala limpa utilizando a designada aproximação *top-down* (de cima para baixo), a qual pretende chegar à nano-estrutura desejada partindo de um bloco de material com tamanho macroscópico, ou por processos *bottom-up* (de baixo para cima), os quais procuram aproveitar as propriedades de auto-organização de átomos e moléculas para produzir estruturas supramoleculares que exibam as propriedades desejadas (Ochekpe et al., 2009). Os materiais quando atingem dimensões nanométricas (entre 1 e 100 nm) exibem propriedades óticas, magnéticas e químicas que os distinguem das estruturas macroscópicas com a mesma composição química (Hristozov e Malsch, 2009). A alteração das propriedades de um material ao atingir a escala nanométrica resulta da associação de dois fatores: a) efeitos quânticos, pois é em objetos com essas dimensões que os efeitos quânticos se manifestam de uma maneira mais evidente e b) área superficial, pois quanto menor for o tamanho de uma partícula mais importantes se tornam os efeitos de superfície pelo aumento da proporção entre a sua área e o seu volume (Owen e Depledge, 2005). Assim, as nanotecnologias procuram aproveitar as novas propriedades que surgem nos materiais quando em escala nanométrica, enquanto a nanociência procura compreender

essas novas propriedades. As nanopartículas mais promissoras são as formadas por carbono (*e.g.* fulerenos e nanotubos), por metais de transição (*e.g.* *quantum dots*, ouro, prata, zinco, titânio) e por polímeros orgânicos (*e.g.* poliestireno), com aplicações em sistemas energéticos (células de combustível e fotovoltaicas), eletrônicos (*nanochips*) e na saúde (agentes de contraste, biosensores, sistemas de libertação controlada de medicamentos) (Aitken et al., 2006). Atualmente, os materiais nano-estruturados são incorporados em múltiplos produtos comerciais, incluindo cosméticos (*e.g.* dióxido de titânio, óxido de zinco e fulerenos), embalagens para alimentos e tecidos usados para fabricar vestuário e artigos domésticos (*e.g.* prata e fulerenos) (Borm et al., 2006; Benn et al., 2011; Love et al., 2012; Rastogi, 2012). Assim, os níveis de exposição ocupacional e pública tendem a aumentar num futuro próximo, devido à vasta aplicabilidade dos nanomateriais sintéticos para melhorar a qualidade e as propriedades de muitos produtos usados diariamente pela sociedade moderna, bem como para o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico e terapêuticos em medicina. Paralelamente, estes materiais tendem a acumular-se no meio ambiente podendo afetar o equilíbrio ecológico dos ecossistemas. Pelo exposto, a avaliação dos potenciais riscos para o ambiente e para a saúde humana resultantes da exposição aos nanomateriais é fundamental e necessária para suportar um quadro legislativo que garanta a sua produção, utilização e deposição de um modo seguro.

Consciente desta problemática, a Comissão Europeia tem vindo a desenvolver esforços para adaptar a legislação já existente aos nanomateriais. Por exemplo, em 2011 emitiu uma recomendação (2011/696/EU) sugerindo que o conceito de nanomaterial fosse incorporado no regulamento (EC) No 1907/2006 - “*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*” (REACH). Adicionalmente, a OECD - “*Organization for Economic Co-operation and Development*” também tem tido um papel importante, patrocinando estudos sobre a segurança dos nanomateriais, considerando aspetos subjacentes à sua produção, manipulação e uso (OECD, 2009). Todavia, um quadro legislativo minimamente seguro só poderá surgir depois de se caracterizar os mecanismos subjacentes à interação dos nanomateriais com os sistemas biológicos, incluindo os seus efeitos toxicológicos para espécies dos vários níveis tróficos, a capacidade de bioacumulação e biomagnificação, influência da via de exposição e dos processos de transformação nos organismos e no ambiente.

1.1.1 Nanomateriais de carbono – os fulerenos

A investigação das propriedades do carbono presente no espaço interestrelar, realizada por Kroto e colaboradores (1985), conduziu à descoberta de uma nova forma alotrópica de carbono, os fulerenos, sendo C_{60} a espécie química mais abundante e abrindo uma nova era na química de carbono. Considerando a grande estabilidade do C_{60} , os investigadores concluíram tratar-se de uma estrutura fechada altamente simétrica, constituída por 20 hexágonos e 12 pentágonos (cada pentágono tem arestas comuns a 5 hexágonos e os pentágonos nunca têm arestas comuns) formando um icosaedro truncado (Fig. 2). Dado que a estrutura proposta foi inspirada nas cúpulas geodésicas do arquiteto americano Buckminster Fuller, Kroto propôs para a molécula de C_{60} o nome de “*Buckminsterfullerene*”. A terminação “ene” (em português “eno”) pretende enfatizar a existência de ligações duplas conjugadas, resultantes do facto de todos os átomos de carbono terem uma hibridização sp^2 , à semelhança do benzeno (Kroto et al., 1985). A estrutura proposta para a molécula é semelhante às tradicionais bolas de futebol, formadas por 12 peças pretas pentagonais e por 20 peças brancas hexagonais, pelo que C_{60} também é designado por *Buckyball*.

No início da década de 90 do século XX, Krätschmer e colaboradores, usando um arco voltaico para vaporizar a grafite em atmosfera de hélio, mostraram que quantidades macroscópicas de C_{60} e de outras moléculas relacionadas, mas com maior massa molecular (e.g. fulerenos C_{70} e C_{76}), podem ser sintetizadas em laboratório (Krätschmer et al., 1990). A produção em massa de C_{60} permitiu disponibilizar material em quantidade suficiente para efetuar a sua caracterização por difração de raios-X, confirmando que a estrutura proposta por Kroto e colaboradores para C_{60} estava correta, e para a realização de inúmeros estudos que suportam a ideia da sua utilização para benefício da humanidade. De facto, os fulerenos apresentam propriedades espetaculares em múltiplos aspetos. Por exemplo, a molécula de C_{60} pode ser considerada uma gaiola poliédrica com 0,711 nm de diâmetro, suficientemente grande para ser observada por espectroscopia eletrónica, mas que exhibe propriedades ondulatórias (descritas pela física quântica), incluindo a formação de imagens de interferência numa rede de difração, tal como fotões e eletrões (Arndt et al., 1999; Rüdél et al., 2002). A difração de raios-X também veio revelar que as moléculas de C_{60} se organizam em estruturas cúbicas de faces centradas, formando um cristal molecular mantido por forças de *Van der Waals*, com as moléculas separadas entre si por uma distância mínima de 0,31 nm (Dresselhaus et al., 1995). Enquanto à temperatura ambiente

as moléculas podem rodar livremente nas suas posições dentro da rede cristalina, o arrefecimento do cristal restringe a liberdade rotacional promovendo um alinhamento discreto das moléculas, no qual uma porção eletronicamente rica de uma molécula fica próxima de porções eletricamente pobres das moléculas vizinhas. Nesta situação, o sólido comporta-se como um semiconductor e cada molécula é uma espécie eletronegativa capaz de aceitar reversivelmente de 1 a 6 eletrões, formando os aniões correspondentes (Echegoyen e Echegoyen, 1998). Esta propriedade tem imensa relevância biológica permitindo racionalizar a sua utilização para modelar o estado redox dos sistemas biológicos (Nielsen et al., 2008), como será apresentado posteriormente. Outro aspeto interessante da organização deste cristal molecular emerge das lacunas tetraédricas e octaédricas entre as moléculas de C_{60} , nas quais é possível intercalar átomos ou pequenas moléculas para modelar as propriedades do material. Por exemplo, a intercalação de metais alcalinos (*e.g.* potássio, rubídio) torna o fulereno C_{60} um supercondutor a baixa temperatura (Holczer et al., 1991).

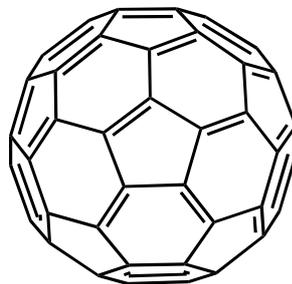


Figura 2 – Estrutura química do fulereno C_{60} .

O carácter eletrónico deficitário de C_{60} e a sua consequente capacidade para participar em reações de oxidação-redução resultam da presença de orbitais moleculares não ligantes LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) com um nível de energia muito próximo do exibido pelas orbitais moleculares ocupadas com maior energia (Powell et al., 2002). Desta característica emergem dois aspetos funcionalmente relevantes: a) a absorção de luz por C_{60} promove a formação de um estado excitado tripleto com elevada

estabilidade e longa duração (Arbogast et al., 1991); b) a foto-excitação do fulereno em meios com oxigénio permite a produção eficiente e contínua de oxigénio singleto por transferência de energia do estado tripleto de C_{60} para o oxigénio molecular, como demonstrado por avaliação da luminescência de 1O_2 (Yamakoshi et al., 2003). O oxigénio singleto é uma espécie muito reativa capaz de oxidar proteínas, ácidos nucleicos e fosfolípidos membranares, causando danos celulares por stresse oxidativo (Yamakoshi et al., 2003; Nielsen et al., 2008). Adicionalmente, a molécula de C_{60} em estado tripleto pode reagir com espécies biológicas reduzidas (*e. g.* NADH) formando o radical aniónico $C_{60}^{\bullet-}$, o qual pode transferir um eletrão para a molécula de oxigénio produzindo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Portanto, a produção de espécies reativas de oxigénio associada à foto-excitação do fulereno pode ocorrer por um mecanismo fotoquímico que envolve a transferência de eletrões (tipo I) e por transferência direta de energia do fotossensibilizador para o oxigénio promovendo a formação do oxigénio singleto (1O_2), mecanismo designado de tipo II (Yamakoshi et al., 2003; Markovic e Trajkovic, 2008). Estas propriedades intrínsecas dos fulerenos, associadas ao facto de não serem facilmente degradados por processos de foto-oxidação, conferem-lhes um grande potencial para ser usados como agentes fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica (Ni et al., 2008; Prylutska et al., 2010). No contexto biológico, a eletronegatividade dos fulerenos traduz-se, na ausência de luz, em relevantes propriedades antioxidantes. Estudos *in vitro* permitiram estimar que cada molécula de C_{60} é capaz de suprimir, pelo menos, 20 radicais (Krusic et al., 1991), exibindo uma capacidade antioxidante 100 vezes superior ao da vitamina E (Yadav e Kumar, 2008). Assim, os fulerenos apresentam também potencial para serem usados no tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson, nas quais a produção excessiva de espécies reativas de oxigénio e o stresse oxidativo associado desempenham um papel importante (Dugan et al., 2001; Prylutska et al., 2008; Yin et al., 2009; Zhou et al., 2010).

A estrutura dos fulerenos com uma cavidade central oca, suficientemente grande para hospedar átomos ou arranjos de átomos, despertou o interesse dos cientistas que rapidamente desenvolveram metodologias para formar os designados fulerenos endoédricos. O nome endoédrico foi sugerido para designar um fulereno com um átomo ou um ião no seu interior, e a simbologia $M@C_{2n}$ é usada para indicar que M é encapsulado por C_{2n} . No caso particular do C_{60} , os fulerenos endoédricos adquirem a fórmula $M@C_{60}$ indicando que M está no interior de C_{60} (Weiss et al., 1988). Apesar de uma grande variedade de elementos químicos já terem sido encapsulados nos fulerenos, o

encapsulamento de metais em geral e de lantanídeos em particular (*e.g.* lantânio La@C₆₀, gadolínio Gd@C₈₂) tem sido particularmente explorado por proporcionar uma nova classe de compostos com potencial em aplicações biomédicas, dado que podem ser usados como agentes de contraste em vários tipos de técnicas imagiológicas, incluindo em medicina nuclear quando preparados com radioisótopos (Bolskar et al., 2003; Tóth et al., 2004; Sitharaman et al., 2007), e como agentes terapêuticos (Yin et al., 2008).

No entanto, um dos fatores limitantes da utilização dos fulerenos em aplicações biológicas emerge da sua baixíssima solubilidade em água e dos meios fisiológicos serem essencialmente aquosos (Tutt e Kost, 1992). Para superar este obstáculo, várias estratégias têm sido usadas, nomeadamente: a) a modificação química da superfície do icosaedro de carbono para obter fulerenos funcionalizados covalentemente com grupos polares (Bosi et al., 2003), b) a incorporação de C₆₀ em estruturas anfifílicas (*e.g.* ciclodextrinas, lipossomas, micelas), as quais permitem aprisionar o fullereno em regiões apolares do seu interior, mantendo a compatibilidade com os meios aquosos devido à presença de uma superfície polar (Cataldo, 2002; Ramakanth e Patnaik, 2008; Zhou et al., 2010); c) preparação de suspensões coloidais pela agitação prolongada das nanopartículas de fullereno em água ou pela transferência das nanopartículas de fullereno solubilizadas em solventes orgânicos para a fase aquosa com recurso a sonicação moderada (Deguchi et al., 2001; Andrievsky et al., 2002; Brant et al., 2006).

O carácter eletrónico deficitário dos fulerenos facilita a sua reação tanto com agentes nucleófilos como com espécies radicalares, permitindo sintetizar uma grande diversidade de fulerenos exoédricos (com grupos ligados à sua superfície) através de reações de adição (Taylor, 2006). A adição controlada de grupos funcionais polares (*e.g.* OH, NH₂ e COOH) à superfície do icosaedro de carbono permite modelar a solubilidade dos fulerenos em água, alargando e diversificando a sua aplicabilidade biológica (Prato, 1997; Rade et al., 2008). Por exemplo, a adição controlada de grupos hidroxilo (OH) à molécula de C₆₀ permite sintetizar uma série de moléculas (Fig. 3) com diferentes propriedades físico-químicas representadas pela fórmula geral C₆₀(OH)_n, em que o n varia entre 12 e 26 (Nielsen et al., 2008; Rade et al., 2008; Partha e Conyers, 2009). A reatividade ímpar da molécula de C₆₀ é bem ilustrada pelos inúmeros derivados quimicamente modificados já sintetizados, os quais incluem compostos com ácidos carboxílicos, aminas, amidas e açúcares (*e.g.* C₆₀(C(COOH)₂, C₆₀(NHCH₂CH₃)₆₋₁₈) (Nielsen et al., 2008).

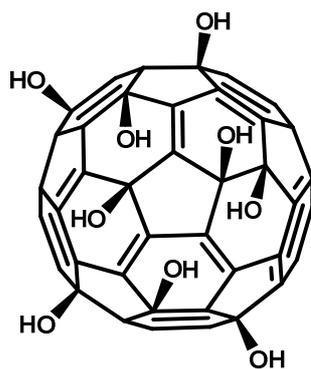


Figura 3 – Estrutura química do $C_{60}(OH)_{18}$.

Apesar da modificação química dos fulerenos pela ligação de grupos polares à sua superfície potenciar as aplicações biológicas deste grupo de compostos, poderá também conduzir a riscos acrescidos para o ambiente e para a saúde humana dada a sua maior solubilidade em água na Natureza e nos fluídos orgânicos. Assim, uma análise de risco, que envolva a avaliação dos efeitos biológicos dos fulerenos é fundamental para que se possa estabelecer normas que garantam a segurança destes compostos desde a sua produção até à sua deposição.

1.2 Toxicologia dos nanomateriais

Os avanços científicos e tecnológicos subjacentes ao desenvolvimento da nanotecnologia têm permitido um aumento crescente da compreensão e do controlo da matéria à escala nanométrica (entre 1 e 100 nm), possibilitando a conceção, o desenho e a produção de materiais, dispositivos e sistemas altamente sofisticados com potencial para promover múltiplos e generalizados benefícios para a sociedade (Aitken et al., 2006). Muitos dos potenciais benefícios da nanotecnologia emergem, como já referido atrás, do facto dos materiais nano-estruturados exibirem propriedades e comportamentos físicos, químicos e biológicos diferentes dos materiais com dimensões macroscópicas com a mesma composição química. Por exemplo, o ouro, que à escala macroscópica é

considerado um material inerte, torna-se altamente reativo quando estruturado em partículas com diâmetro inferior a 10 nm (Phala e Steen, 2007); materiais semicondutores que à escala macroscópica não apresentam capacidade significativa de emitir luz, quando fabricados na forma de nanopartículas (“*quantum dots*”) exibem propriedades fluorescentes que lhes permitem a emissão de luz com uma cor que varia do violeta ao vermelho, dependente do diâmetro das partículas (Pinaud et al., 2006). Para além de versões nano-estruturadas de muitos materiais existentes à escala macroscópica, novos materiais exibindo características e propriedades únicas foram também produzidas pela nanotecnologia. Os fulerenos esféricos (*e.g.* C₆₀) e os seus parentes alongados (*e.g.* nanotubos de carbono) constituem apenas a mais conhecida das várias classes de novos materiais que emergiram da nanotecnologia. Os nanotubos de carbono são, entre os materiais conhecidos, um dos que apresentam maior resistência mecânica e que, dependendo da sua configuração estrutural, pode exibir uma condutividade elétrica do tipo metálica, propriedades semicondutoras ou mesmo propriedades isolantes, conferindo-lhe um enorme potencial de aplicação (Bandaru, 2007).

As propriedades exibidas pelos materiais nano-estruturados proporcionam não apenas potenciais benefícios nos campos social e económico, mas também riscos para o ambiente e saúde humana. A compreensão dos mecanismos subjacentes à interação dos diversos materiais nano-estruturados com os sistemas biológicos, apesar de ser um pré-requisito fundamental para identificar e caracterizar os riscos inerentes ao desenvolvimento da nanotecnologia, permanece bastante incompleta. Apesar do grande esforço científico (e material) despendido nos últimos anos para caracterizar o efeito biológico de muitos nanomateriais, várias questões elementares e fundamentais continuam no essencial por esclarecer. Entre elas destacam-se: Os atuais métodos de avaliação toxicológica serão adequados para avaliar o impacto toxicológico dos materiais nano-estruturados nos organismos e nos ecossistemas? A exposição humana e ambiental aos nanomateriais pode ser prevista e quantificada? Como é que as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais se relacionam com a resposta biológica observada em organismos expostos? Quais os mecanismos moleculares subjacentes à toxicocinética (absorção, distribuição, acumulação, biotransformação e excreção) dos nanomateriais?

A análise do risco como atividade organizada, conduzida por organismos governamentais oficiais, iniciou-se na década de 70 do século passado com o objetivo de garantir a segurança alimentar e compreende três etapas autónomas mas interligadas, nomeadamente: avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco (Jardine et al.,

2003). Atualmente, a avaliação do risco é o principal instrumento utilizado na análise do binómio custos/benefícios aplicado a todas as atividades humanas com o objetivo de salvaguardar a saúde pública e ambiental sem comprometer o desenvolvimento económico e social. Note-se que a gestão adequada dos riscos associados a várias tecnologias e produtos perigosos (*e.g.* energia elétrica, Raios-X e gasolina) tem permitido a sua utilização segura pela humanidade. Em geral, o risco, ou probabilidade de resultar um efeito adverso, atribuído a um dado agente químico ou físico é função das propriedades tóxicas intrínsecas desse agente (perigo) e da magnitude, duração e frequência da exposição (Kleinjans, 2003). Para cada tóxico, as características da exposição e o espectro de efeitos indesejados (resposta biológica) caminham em conjunto numa correlação habitualmente designada como dose-resposta. Na prática, as curvas dose-resposta obtidas experimentalmente descrevem a distribuição de respostas para diferentes doses numa população de indivíduos, permitindo determinar parâmetros toxicologicamente relevantes como o LD_{50} (dose mínima necessária para matar 50% dos elementos de uma população exposta ao tóxico) e o *NOAEL* (dose máxima que não produz efeitos adversos observáveis, na designação anglo-saxónica *No Observed Adverse Effect Level*), os quais são utilizados para comparar a toxicidade de diferentes compostos e para estabelecer os limites de segurança para a exposição a cada um deles. Assim, a informação que emerge das curvas dose-resposta tem grande relevância para garantir a saúde pública e ambiental, dado que permite estabelecer os limites de segurança para a exposição a agentes químicos e físicos. No entanto, a toxicologia também mostrou que efeitos adversos de natureza estocástica ou probabilística (*e.g.* cancro), os quais podem ocorrer décadas após a exposição, não podem ser previstos pela abordagem determinista subjacente às curvas dose-resposta (Kalberlah et al., 2003). Abordagens específicas para avaliar estes aspetos probabilísticos, requerendo estudos de longa duração em populações com um grande número de indivíduos (*e.g.* estudos epidemiológicos), passaram também a ser tomadas em consideração, tornando a análise do binómio custos/benefícios um processo dinâmico, que altera os limites de exposição para cada agente tóxico de acordo com a informação disponível a cada momento.

Portanto, a avaliação efetiva dos riscos associados a um dado nanomaterial (tal como para qualquer outro produto) requer informação efetiva das suas características toxicológicas intrínsecas e de estimativas realistas do potencial de exposição das populações humanas e dos ecossistemas associadas a cada uma das fases do ciclo de vida desse nanomaterial, isto é, desde a fase de investigação e desenvolvimento até ao seu

destino final, passando pela fase de produção e de consumo e/ou utilização (Kleijnans, 2003). Neste contexto, a racionalização dos impactos biológicos dos nanomateriais apresenta inúmeras dificuldades resultantes do facto de a nanotecnologia produzir a um ritmo crescente nanomateriais com uma grande diversidade de composições químicas e, para a mesma composição química, materiais que podem apresentar múltiplas características e propriedades suscetíveis de condicionar os seus efeitos biológicos. As seguintes características têm sido consideradas particularmente relevantes em termos toxicológicos (Johnston et al., 2010):

- a) Composição química e organização estrutural dos nanomateriais, incluindo a química da sua superfície, que definem a sua polaridade, hidrofobicidade e reatividade;
- b) Razão entre a área superficial e o volume, a qual aumenta com o decréscimo do tamanho das nanopartículas e condiciona a sua capacidade de interagir com as moléculas vizinhas;
- c) Carga superficial das nanopartículas, a qual é responsável por interações eletrostáticas e condiciona a sua solubilidade/estabilidade em água e nos fluídos biológicos e, conseqüentemente, a sua interação com os sistemas biológicos.

A relação entre as características físicas e químicas dos materiais nano-estruturados e os seus efeitos biológicos tem sido investigada por vários grupos de investigação utilizando diferentes abordagens mas com objetivos comuns, isto é, desvendar os mecanismos subjacentes aos seus efeitos biológicos; estabelecer a gama de concentrações em que exercem efeitos benéficos, para a utilização em aplicações biomédicas, e efeitos tóxicos para estabelecer os limites máximos de exposição que garantam a saúde humana e ambiental. Por exemplo, ensaios desenhados para avaliar a toxicidade aguda de vários nanomateriais (ZnO, Al₂O₃, C₆₀ e nanotubos de carbono), na gama de concentrações de 0,01 a 1000 mg/L, mostraram que a toxicidade para a *Daphnia magna* decresce na série ZnO > C₆₀ > nanotubos de carbono > Al₂O₃, evidenciado que a composição química dos nanomateriais é uma característica determinante da sua toxicidade pelo que avaliação de riscos deve ser efetuada, individualmente, para cada composto nano-estruturado (Zhu et al., 2009).

Estudos laboratoriais também realçam a importância da química superficial dos nanomateriais na sua interação com os sistemas biológicos. Um estudo efetuado para avaliar o efeito de partículas de ferrite de níquel (NiFe₂O₄) nano-estruturadas com o diâmetro médio de 10 e 50 nm na proliferação de células neuro2A mostrou que os efeitos

tóxicos, na gama de concentrações de 0 a 200 µg/ml, são independentes do tamanho das nanopartículas. No entanto, o revestimento das nanopartículas com moléculas de ácido oleico aumenta significativamente a toxicidade de ambas as nanopartículas com uma magnitude dependente do tamanho. Assim, as partículas revestidas com maior diâmetro exibiram maior citotoxicidade do que as de menor diâmetro. O aumento da citotoxicidade resultante do revestimento da ferrite de níquel com ácido oleico foi interpretado como resultando de um aumento do carácter lipofílico do nanomaterial promovido pelo ácido oleico, que devido à sua lipoflicidade acentua a interação do composto com as membranas celulares, aumentando a sua biodisponibilidade e consequentemente os seus danos celulares (Yin et al., 2005). No entanto é importante salientar que o revestimento de nanomateriais também pode decrescer a sua toxicidade. Por exemplo, o revestimento de nanopartículas de óxido de alumínio (Al_2O_3) com fenantreno (hidrocarboneto aromático policíclico) decresce significativamente a fitotoxicidade destas nanopartículas, como detetado pelos seus efeitos na taxa de crescimento das raízes de várias plantas de interesse comercial, nomeadamente: *Zea mays* (milho), *Cucumis sativus* (pepino), *Glycine max* (soja), *Brassica oleracea* (repolho) e *Daucus carota* (cenoura). A redução da fitotoxicidade dos nanomateriais de óxido de alumínio resultante do revestimento foram explicadas pelo facto do sistema de revestimento bloquear os grupos hidroxilos livres à superfície do óxido de alumínio, fundamentais para que estas nanopartículas exerçam toxicidade (Yang e Watts, 2005).

Os exemplos citados mostram que a modificação da química superficial dos nanomateriais resultante de interações não covalentes com outros compostos modula os seus efeitos biológicos. Assim, nos processos de avaliação toxicológica é importante também considerar a possibilidade da química superficial dos nanomateriais ser alterada por interação com compostos existentes quer no meio ambiente quer nos fluidos biológicos. Os nanomateriais de carbono (fulereno C_{60}) são moléculas capazes de adsorver inúmeros compostos, incluindo, compostos organometálicos (Ballesteros et al., 2000), poluentes ambientais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Baun et al., 2008) e ácidos húmicos (Li et al., 2008; Klavins e Anson, 2010). A adsorção de moléculas pelo C_{60} deverá promover alterações tanto no comportamento ambiental e toxicológico do fulereno como no dos compostos adsorvidos. Neste contexto, Li e colaboradores (2008) detetaram que a adsorção de ácidos húmicos ao fulereno C_{60} (a qual deverá promover alterações na química superficial das nanopartículas de fulereno) diminuiu a biodisponibilidade do fulereno no solo e a sua toxicidade para a bactéria *Escherichia Coli*.

Adicionalmente, Baun e colaboradores (2008) mostraram que a toxicidade resultante da administração simultânea de fulereno C_{60} e fenantreno em *Daphnia magna* e na alga *P. Subcapitata* é superior à prevista pela soma dos efeitos de cada um dos compostos quando administrados isoladamente. Este efeito sinérgico foi explicado pelo facto da adsorção do fenantreno ao C_{60} aumentar de um modo significativo a biodisponibilidade do hidrocarboneto aromático policíclico e, conseqüentemente, o seu potencial toxicológico (Baun et al., 2008).

Dado que a carga superficial dos nanomateriais é uma característica importante para modelar as suas interações com membranas celulares, com reflexos na toxicidade e no processo de internalização celular (passo fundamental em inúmeras aplicações biomédicas), a preparação de suspensões aquosas de nanomateriais com diferenças ao nível da carga superficial tem merecido especial atenção pela comunidade científica. Neste sentido, vários estudos têm evidenciado os efeitos da carga superficial dos nanomateriais na toxicidade exibida pelas suas suspensões aquosas. Liu e colaboradores (2011) mostraram que nanomateriais de poliestireno com carga superficial positiva apresentam maior toxicidade para as células NIH 3T3 e HeLa do que os seus congéneres com carga superficial negativa, por afetarem o processo de divisão celular destas células após internalização. O comportamento toxicológico dos nanomateriais de óxido de cério também depende da carga superficial, como demonstrado em estudos com linhas celulares não transformadas (H9c2 e HEK293) e em linhas celulares de cancro (A549 e MCF-7). Assim, os nanomateriais com carga superficial positiva induziram toxicidade nas células H9c2, A549 e HEK293, enquanto os com carga superficial negativa apenas a exerceram nas células A549. Estas diferenças foram explicadas por alterações no processo de internalização dos nanomateriais, o qual depende do tipo de célula, e para o mesmo tipo de célula, da carga superficial dos nanomateriais. Por exemplo, quando a internalização, de nanopartículas de óxido de cério os conduz aos lisossomas, o carácter oxidante exibido por estes nanomateriais no ambiente ácido do lisossoma promove a morte celular. Na gama de concentrações utilizada (1 mM), os mesmos nanomateriais não promoveram toxicidade nas células MCF-7, dado que não foram internalizados por estas células (Asati et al., 2010). A carga superficial das formulações aquosas de nanomateriais parece desempenhar também um papel importante no processo pelo qual induzem a morte celular. Schaeublin e colaboradores (2011) ao estudarem o efeito da carga superficial na toxicidade de nanomateriais de ouro, avaliando os seus efeitos em queratinócitos humanos (HaCaT), detetaram que as formulações com carga superficial positiva e negativa promovem a morte

celular por apoptose, enquanto as formulações com carga neutra induzem morte celular por necrose. Outros investigadores já haviam demonstrado que as formulações de nanomateriais de ouro com carga positiva apresentam maior toxicidade para os fibroblastos do que as suas congêneres com carga negativa (Goodman et al., 2004)

A dimensão dos nanomateriais, com reflexo na área superficial, também deve modelar a sua interação com os sistemas biológicos, dado que determina a proporção relativa de átomos (ou grupos de átomos) à sua superfície, os quais têm possibilidade de reagir com moléculas vizinhas. Um dos primeiros estudos a mostrar que a toxicidade dos nanomateriais não pode ser prevista a partir da toxicidade exibida pelos materiais de dimensões macroscópicas com a mesma composição química foi elaborado em 1994 por Oberdörster e colaboradores, utilizando partículas de óxido de titânio com 250 e com 20 nm de diâmetro (Oberdörster et al., 1994). Neste estudo, os ratos expostos durante doze dias a uma atmosfera contendo 23,5 mg/m³ de óxido de titânio (TiO₂) nano-estruturado, com 20 nm de diâmetro, exibiram um processo inflamatório grave ao nível dos pulmões, enquanto os animais expostos a doses similares (22,3 mg/m³) de partículas de óxido de titânio com 250 nm de diâmetro não apresentaram quaisquer efeitos inflamatórios ao nível do sistema respiratório (Oberdörster et al., 1994). Adicionalmente, a exposição dos animais durante longos períodos (até 90 dias) a nanopartículas de óxido de titânio (Oberdörster et al., 1994; Lam et al., 2004), tal como a nanotubos de carbono (Lam et al., 2004), para além de desencadear processos inflamatórios nos alvéolos pulmonares, causa lesões crónicas como fibroses e tumores. Estes efeitos parecem estar essencialmente relacionados com o tamanho dos nanomateriais dado que as partículas com tamanhos superiores a 100 nanómetros são rapidamente eliminadas pelos macrófagos alveolares (Oberdörster et al., 1994). Os nanotubos de carbono são também capazes de se deslocarem do pulmão e atingirem outros órgãos como o coração, induzindo efeitos cardiovasculares adversos (Li et al., 2007b). Estudos epidemiológicos/toxicológicos efetuados em humanos expostos a atmosferas contendo partículas com tamanhos inferiores a 100 nm, resultantes de diferentes fontes de poluição atmosférica, também suportam a ideia de que os materiais nano-estruturados, independentemente da composição química, são capazes de induzir efeitos tóxicos nos sistemas respiratório e cardiovascular (Moore, 2006; Simko e Mattsson, 2010). Portanto, estes trabalhos mostram inequivocamente que o tamanho dos nanomateriais assume relevância toxicológica, em particular quando os organismos são expostos pela via respiratória.

De facto, o risco que os nanomateriais representam para a saúde humana e/ou de qualquer outra espécie depende: a) da via de exposição; b) da frequência e magnitude da exposição; c) da suscetibilidade dos diferentes organismos expostos e d) do comportamento que cada material nano-estruturado exhibe no meio biológico. Todavia, para avaliar o risco associado à exposição aos nanomateriais é necessário conhecer os níveis de exposição a este tipo de compostos para que se possam estabelecer limites de exposição específicos e implementar medidas de prevenção adequadas. Neste contexto, a avaliação toxicológica destes compostos utilizando doses que mimetizem as condições de exposição é um aspeto necessário. Alguns esforços estão a ser realizados nesse sentido, todavia a informação disponível sobre o nível de exposição humana aos nanomateriais é ainda insuficiente para que se possa fazer uma avaliação do risco. No que diz respeito aos fulerenos, as vias de exposição humana consideradas mais relevantes para a avaliação do risco humano são a via respiratória e a via dérmica. Exposição pela via respiratória é apenas relevante para os trabalhadores envolvidos na produção e manipulação dos fulerenos sendo, essencialmente, uma exposição do tipo ocupacional. Por outro lado, a exposição dérmica estende-se à população em geral, em particular à população que utiliza cosméticos contendo fulerenos. De um modo geral, a quantidade de fulerenos incorporados nos lipossomas ou em outras estruturas lipídicas utilizadas para produzir os cosméticos é inferior a 0,5% da massa total de lípido (Aschberger et al., 2010). A incorporação de fulerenos neste tipo de produtos promove a sua entrada e disseminação no ambiente, possibilitando a exposição por via digestiva dos seres humanos e de outros animais. No contexto respiratório, os estudos de avaliação toxicológica com os fulerenos mostram que ratos expostos durante 28 dias (6 horas por dia de exposição) ou 10 dias (3 h por dia de exposição) a uma atmosfera contendo 0,12 ou 2,22 mg/m³ de C₆₀, respetivamente, não apresentam efeitos inflamatórios ou tóxicos nos pulmões (Baker et al., 2008; Fujita et al., 2009). Adicionalmente, os estudos efetuados para avaliar a toxicidade dos fulerenos resultante da exposição dérmica evidenciam que os fulerenos não promovem efeitos tóxicos agudos na pele (Xia et al., 2010). No entanto, os efeitos associados à exposição crónica não são conhecidos, e a utilização contínua de cosméticos contendo fulerenos envolve uma exposição crónica. De facto, os dados atualmente disponíveis não permitem fazer estimativas realistas do potencial de exposição das populações humanas e dos ecossistemas aos fulerenos nem das concentrações máximas sem efeitos adversos observáveis, impossibilitando que se faça a análise do risco associado à produção e uso dos nanomateriais. Portanto, é premente investigar, de um modo integrado, os efeitos

biológicos associados aos fulerenos, avaliando os efeitos agudos e crônicos em modelos com diferentes níveis de complexidade em ensaios *in vitro* (e.g. membranas biológicas, mitocôndrias, células) e também em ensaios *in vivo* com organismos representantes de vários grupos taxonômicos (e.g. bactérias, fungos, plantas e animais).

1.3 Os nanomateriais e as suas aplicações de interesse farmacológico

A nanotecnologia tem prestado um contributo importante no diagnóstico, na monitorização e no tratamento de diversas doenças, tendo sido proposta a denominação de Nanomedicina à área médica que envolve a utilização de materiais nanotecnológicos (Medina et al., 2007). Nas secções seguintes, dar-se-á relevo a duas áreas em que os nanomateriais, nomeadamente de carbono, apresentam grandes potencialidades para intervenções terapêuticas.

1.3.1 Os nanomateriais como reguladores do equilíbrio oxido-redutor da célula

Nos organismos eucariotas, a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, na designação anglo-saxónica *Reactive Oxygen Species*) emerge naturalmente como consequência da organização e topologia do sistema respiratório na membrana interna da mitocôndria que assegura o metabolismo aeróbio. Note-se que a transferência dos eletrões do NADH (ou do FADH₂) para o oxigénio molecular no designado sistema respiratório envolve três complexos proteicos (complexos I, III, IV ou complexos II, III, IV) e dois transportadores móveis (ubiquinona e citocromo *c*) organizados numa matriz lipídica que lhe permite liberdade rotacional e translacional. Adicionalmente, cada complexo proteico resulta de vários polipeptídeos, uns codificados pelo genoma nuclear e outros pelo genoma mitocondrial, que se associam por ligações não covalentes para formar os complexos enzimáticos funcionais no ambiente peculiar e único proporcionado pelo elevado conteúdo de cardiolipinas da membrana interna da mitocôndria. Por um lado, esta organização do sistema respiratório apresenta a vantagem de permitir que a energia das reações de oxidação-redução seja utilizada de modo gradual para criar o gradiente eletroquímico de

protões, o qual é aproveitado pela F_0F_1 -ATP sintase para sintetizar ATP. Por outro lado, esta organização também permite que os eletrões possam escapar do sistema respiratório produzindo espécies reativas (sendo as ROS as mais comuns nos ambientes ricos em oxigénio onde a vida dos organismos eucariotas se desenvolve), capazes de iniciar processos oxidativos que danificam ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, comprometendo o normal funcionamento das células. A produção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ao nível dos complexos I e III é um facto bem documentado (Boelsterli, 2007). Para evitar o dano oxidativo subjacente à produção de ROS e manter o equilíbrio óxido-redutor fundamental ao bom funcionamento das células, os organismos eucariotas desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, os quais podem ser genericamente agrupados em sistemas enzimáticos (*e.g.* superóxido dismutases, peroxidases e catalase) e não enzimáticos (*e.g.* glutatião, ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenoides, flavenóides). Portanto, quando a produção de espécies reativas de oxigénio excede a capacidade do sistema de defesa antioxidante surge o designado stresse oxidativo (Valko et al., 2007).

Neste contexto, não admira que a disfunção mitocondrial e o stresse oxidativo sejam marcadores fenotípicos de inúmeras patologias (*e.g.* aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes) e de manifestações tóxicas de diversos xenobióticos (Cooke et al., 2003; Zhao e Zhao, 2013). Eventuais “erros” na organização funcional do complexo I e/ou III da cadeia respiratória que favoreçam a transferência dos eletrões diretamente para o oxigénio molecular, para além de promoverem uma disfunção mitocondrial, conduzem à produção excessiva do radical superóxido, desencadeando a cascata de reações subjacente ao stresse oxidativo. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é facilmente transformado em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o qual é convertido no radical hidroxilo (OH^{\bullet}) na presença de iões metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}), como descrito pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Thomas et al., 2009). O radical hidroxilo é uma espécie química extremamente reativa que pode reagir com a maioria das moléculas biológicas danificando lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos membranares, alvos muito suscetíveis a stresse oxidativo e, porventura, os mais estudados, na presença de espécies reativas de oxigénio (*e.g.* OH^{\bullet}), sofrem um processo degradativo conhecido genericamente por peroxidação lipídica. Este processo inicia-se com a remoção de um átomo de hidrogénio de um grupo metileno (CH_2) adjacente a duas ligações duplas da cadeia hidrocarbonada do lípido polinsaturado, por ação de um radical livre, originando a formação de um carbono com um eletrão desemparelhado na cadeia lipídica (radical lipídico). O radical lipídico

resultante é estabilizado por rearranjo molecular, produzindo um dieno conjugado que, ao reagir com uma molécula de oxigénio, forma o radical peróxido. Se este radical não for neutralizado pelo sistema de defesa antioxidante da célula, propaga o processo de peroxidação lipídica reagindo com outros lípidos adjacentes formando hidroperóxidos lipídicos, também eles capazes de propagar o processo de peroxidação (Fig. 4). Esta série de reações de peroxidação lipídica pode provocar danos mitocondriais e celulares muito superiores ao das espécies reativas de oxigénio que iniciaram o processo (Wagner et al., 1994). Assim, a peroxidação lipídica reflete-se na organização funcional das membranas mitocondriais agravando a disfunção mitocondrial, podendo desencadear um processo de morte celular por apoptose ou por necrose (Fig. 5).

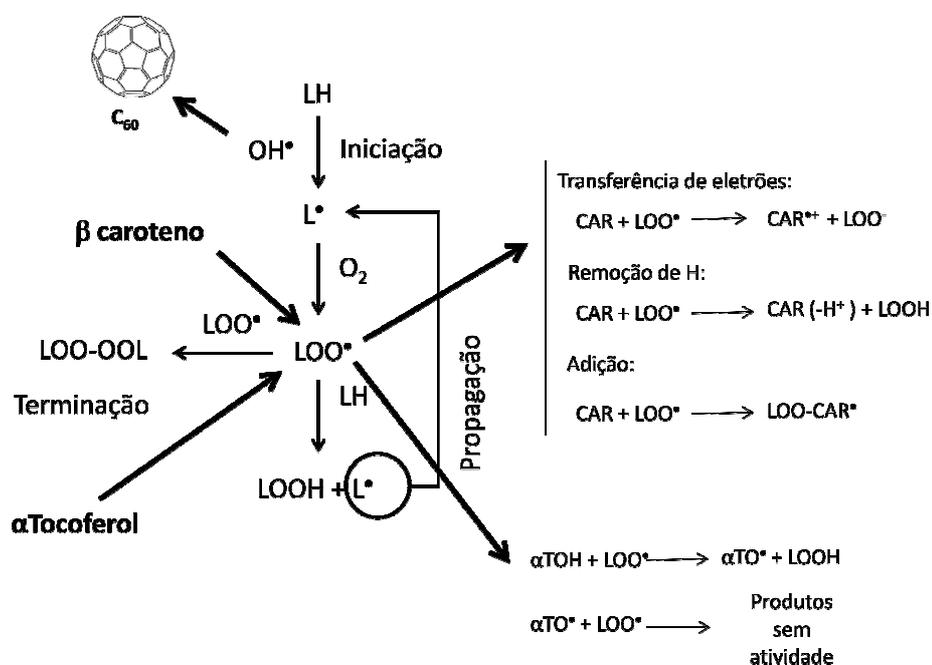


Figura 4 – Processo de peroxidação lipídica. Este processo, constituído por três fases: iniciação, terminação ou propagação, inicia-se com a remoção do átomo de hidrogénio ao lípido polinsaturado (designado por L) por parte do radical livre (OH^\bullet) e forma-se um radical lipídico (L^\bullet), que na presença de oxigénio, se transforma em radical peróxido (LOO^\bullet). Este radical pode ser neutralizado por compostos antioxidantes, como β -caroteno (CAR) ou α -tocoferol, e é convertido em outras espécies sem dano para a célula ou pode reagir com outros lípidos e expandir o processo de peroxidação lipídica a outros lípidos (propagação). O fulereno C_{60} pode evitar a peroxidação lipídica por reação com o radical hidroxilo ou interromper a propagação das reações oxidativas por supressão de radicais centrados em carbono.

O óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) é uma espécie reativa de azoto produzida aquando da metabolização da L-arginina que também apresenta relevância biológica tanto em processos de stresse oxidativo como em processos de sinalização celular, incluindo os que regulam a pressão sanguínea e a resposta imunitária (Valko et al., 2007). Nos processos inflamatórios, $\text{NO}\bullet$ é capaz de reagir com o radical superóxido para formar peroxinitrilo (ONOO^-), o qual promove a oxidação lipídica e proteica, inibe a respiração mitocondrial e danifica o material genético das células (Virág et al., 2003). Note-se que danos irreversíveis no material genético da célula podem conduzir a múltiplas situações patológicas, incluindo as caracterizadas por proliferação celular descontrolada (*e.g.* cancro) e as que emergem de excessiva morte celular por apoptose (Ott et al., 2007).

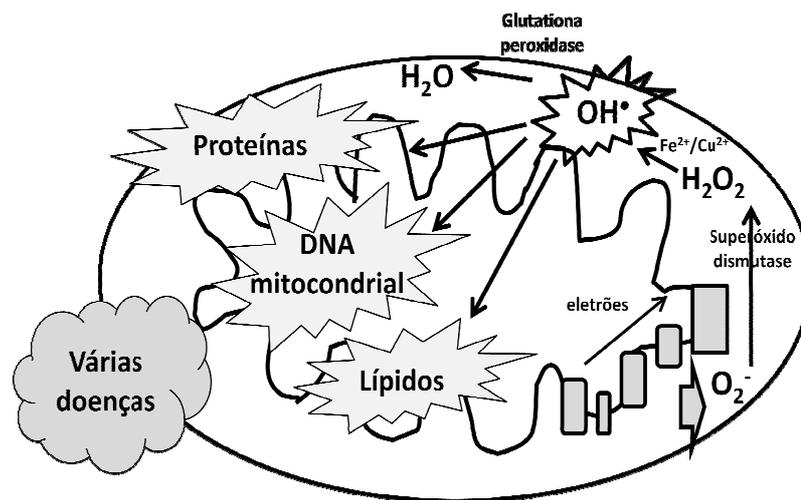


Figura 5 – A mitocôndria produz espécies reativas de oxigénio que podem causar danos celulares. Durante a respiração mitocondrial forma-se o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que é transformado pela superóxido dismutase em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Na presença de íons metálicos ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$), H_2O_2 é convertido em radical hidroxilo (OH^\bullet) que é capaz de oxidar proteínas, lípidos e danificar o DNA mitocondrial proporcionando o desenvolvimento de várias doenças.

No contexto do stresse oxidativo, os fulerenos são uma classe de nanomateriais de carbono com características físico-químicas únicas, dado que uma só molécula pode suprimir vários radicais livres. Por este motivo, a molécula de C_{60} é normalmente designada de “esponja” de radicais livres (Krusic et al., 1991; McEwen et al., 1992). Estas

características conferem aos fulerenos um elevado potencial para serem utilizados como agentes antioxidantes no tratamento de patologias que tenham associados elevados níveis de stresse oxidativo, incluindo doenças neurodegenerativas e cancro. Neste contexto, estudos *in vivo* utilizando ratos, mostraram que o fulereno endoédrico, $[\text{Gd}@C_{82}(\text{OH})_{22}]_n$ é capaz de reduzir em 60% o tamanho de um tumor hepático e inibir a formação de metástases (Chen et al., 2005). De acordo com os autores, estes efeitos resultaram do facto do fulereno alterar a resposta imunológica dos animais e melhorar o seu sistema de defesas antioxidantes. A capacidade deste composto para evitar a peroxidação lipídica, suprimindo as espécies reativas de oxigénio que iniciam o processo, foi também evidenciada por outros investigadores em ensaios *in vivo* (Yin et al., 2008). Estudos *in vitro*, utilizando astrócitos e neurónios de ratos, mostraram que a molécula de C_{60} com ácido malónico ligado remove o radical superóxido e peróxido de hidrogénio do meio e diminui a produção basal do radical superóxido pelas mitocôndrias (Dugan et al., 2001). O tratamento de ratos com esclerose lateral amiotrófica com este congénere do C_{60} mostrou promover uma regressão dos sintomas da doença e um aumento da esperança de vida dos animais (Dugan et al., 1997), evidenciando um comportamento semelhante ao da enzima superóxido dismutase (Ali et al., 2004). Todavia, o fulereno C_{60} pode também produzir espécies reativas de oxigénio e promover dano oxidativo nas células. Por exemplo, a absorção de luz pelo C_{60} promove a formação de um estado excitado tripleto que pode reagir com espécies biológicas reduzidas (*e. g.* NADH) formando o radical aniónico $C_{60}^{\bullet-}$, o qual pode transferir um eletrão para a molécula de oxigénio produzindo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e iniciar a cascata oxidativa descrita que culmina com o dano celular subjacente ao stresse oxidativo (Yamakoshi et al., 2003; Zhao et al., 2008).

1.3.2 Os nanomateriais como vetores para a entrega de fármacos

Considerando a definição de nanomateriais, segundo a qual se incluem sob essa designação todos os materiais com dimensões inferiores a 100 nm, cabem dentro dessa categoria várias classes de nanopartículas com promissoras aplicações farmacológicas, entre as quais lipossomas, emulsões, polímeros, partículas metálicas, nanopartículas cobertas de ouro, nanomateriais de carbono e “quantum dots” (Medina et al., 2007). Uma das áreas da Nanomedicina em que o desenho de novos nanomateriais tem assumido

grande importância diz respeito à entrega de fármacos. De facto, as características dos nanomateriais (particularmente o tamanho reduzido e elevada área superficial) conferem-lhes propriedades adequadas ao transporte de vários agentes terapêuticos como ácidos nucleicos, peptídeos e compostos de baixo peso molecular. Fármacos com baixa solubilidade nos fluidos orgânicos e baixa biodisponibilidade, sendo rapidamente eliminados do organismo pelo sistema reticuloendotelial, encontram nos sistemas nano-estruturados proteção e aumento da solubilidade e estabilidade no seu percurso dentro do organismo até aos locais-alvo (Medina et al., 2007). Para além disso, a toxicidade associada aos fármacos é normalmente diminuída com a utilização dos nanomateriais.

Neste contexto, os lipossomas e os polímeros têm sido os nanomateriais mais utilizados como sistema de entrega de fármacos. Estes compostos são facilmente biodegradáveis, não se acumulam nos tecidos e não representam um risco significativo para o organismo. Por outro lado, são capazes de encapsular, aprisionar ou complexar o fármaco libertando-o de forma controlada, podendo ainda ser guarnecidos de moléculas à sua superfície que auxiliam o seu direcionamento para as células-alvo (Sapra e Allen, 2003). Diferentes estratégias têm vindo a ser desenvolvidas para aumentar a eficiência destes nanomateriais como vetores tendo em conta as características do alvo terapêutico e a via de administração. São reconhecidas como bem-sucedidas formulações com fármacos anti-cancerígenos, como doxorubicina (Doxil[®]) e paclitaxel (Genexol-PM[®] e Abraxane[®](ABI-007)), entre outras (Kozira et al., 2004; Barraud et al., 2005; Cheng et al., 2010; Egusquiaguirre et al., 2012).

Sistemas nano-estruturados têm sido também desenvolvidos para a entrega de ácidos nucleicos com vista ao tratamento de vários tipos de patologias que envolvem deficiências genéticas hereditárias ou adquiridas, como doenças vasculares e neurodegenerativas e cancro (Al-Dosari e Gao, 2009). Pela sua importância no âmbito da terapia génica, a entrega de material genético por nanosistemas, os obstáculos que esses sistemas terão de vencer para levarem a bom termo o objetivo para que foram desenhados e as estratégias desenvolvidas com esse fim constituem o tema tratado na secção seguinte.

1.3.2.1 Os nanomateriais como vetores para a entrega de ácidos nucleicos e as suas potencialidades na terapia gênica

A terapia gênica constitui uma estratégia terapêutica destinada a prevenir, corrigir ou eliminar, a nível molecular, as causas de uma grande diversidade de patologias, recorrendo à entrega intracelular de ácidos nucleicos, DNA, na forma de um plasmídeo (a fim de corrigir um defeito genético ou introduzir um gene terapêutico) ou RNA (a fim de promover a inibição da expressão de um gene). Esta última estratégia tem atraído grande interesse como intervenção terapêutica, com aplicação em vários tipos de patologias (cancro, doenças respiratórias, infecções virais, doenças oculares, entre outras; (Elbashir et al., 2001; Zhang et al., 2005; Fattal e Bochot, 2006; Kleinman et al., 2008; Davidson e McCray, 2011). Com o propósito de inibir a expressão de genes, moléculas de diversos tipos têm sido utilizadas: ribozimas, isto é, moléculas de RNA que catalizam a clivagem de moléculas de RNA mensageiro que lhe são complementares; oligonucleótidos “antisense” constituídos por cadeias simples de desoxi-ribonucleótidos ou ribonucleótidos que se ligam a sequências complementares de ácidos nucleicos, inibindo processos de transcrição ou tradução; e, mais recentemente, pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNA, na designação anglo-saxónica *small interference RNA*). Neste último caso, é utilizada a via endógena do RNA de interferência (Tiemann e Rossi, 2009) para silenciar genes de interesse, introduzindo nas células-alvo siRNAs ou plasmídeos que codificam essas moléculas de RNA (shRNA, na designação anglo-saxónica *short hairpin RNA*). O pequeno RNA de interferência, constituído por 20 a 30 nucleótidos, suprime a expressão de um gene específico (gene-alvo) promovendo a degradação do RNA mensageiro (Tiemann e Rossi, 2009). Têm sido sintetizados siRNAs com diferentes sequências de nucleótidos e capazes de silenciar vários genes do genoma humano, que estão disponíveis comercialmente. O siRNA, ao entrar na célula, interage com proteínas endógenas do citoplasma com atividade catalítica (ribonucleases) formando um complexo designado “complexo indutor de silenciamento” (RISC, na designação anglo-saxónica *RNA-induced silencing complex*). A cadeia simples de siRNA incluída no complexo RISC ativo conduz este complexo para a molécula de RNA mensageiro-alvo, promovendo a sua clivagem e degradação e suprimindo, assim, a expressão do gene-alvo (Aagaard e Rossi, 2007). Para além da utilização direta de siRNAs, tem-se recorrido também, como já foi referido, a plasmídeos que codificam siRNAs (shRNA). Enquanto os siRNAs apenas têm de ser entregues no citoplasma das células para promoverem o silenciamento do gene-alvo, os

shRNAs têm de alcançar o núcleo para serem previamente transcritos. A vantagem destes últimos reside, porém, no facto de o silenciamento ocorrer por um longo período de tempo, ao passo que o silenciamento mediado por siRNAs é apenas transiente (Wang et al., 2010).

No entanto, para que os ácidos nucleicos cumpram dentro da célula os objetivos para que foram desenhados, têm de ser transportados até aos locais onde atuam e de ser protegidos, nesse percurso, da degradação por nucleases. Assim, um dos grandes desafios que se coloca à terapia génica consiste em desenvolver vetores que não só assegurem o transporte do material genético no organismo e previnam a sua degradação, como o conduzam especificamente às células-alvo (poupando as células sãs de tecidos adjacentes) e promovam a sua internalização, para que, finalmente dentro da célula, os ácidos nucleicos possam desempenhar o seu papel no local apropriado, isto é, núcleo ou mitocôndria, no caso de DNA, e citoplasma no caso de RNA (Al-Dosari e Gao, 2009). Ao nível da célula, um passo crucial neste processo consiste em vencer a barreira imposta pela membrana celular e, no caso do DNA, também pela membrana nuclear. Neste contexto, à parte da fagocitose (que só ocorre em células especializadas como os macrófagos), a endocitose tem sido reconhecida como o principal processo de internalização do material genético na célula (Wong et al., 2007). Nos processos endocíticos (Fig. 6) incluem-se a macropinocitose, a endocitose mediada por clatrina, a endocitose mediada por cavéolos e a endocitose independente de clatrina e de cavéolos (Conner e Schmid, 2003). A endocitose mediada por recetores pode ser facilitada pela utilização de ligandos específicos (Hashida et al., 2001), entre os quais se destacam anticorpos, açúcares como galactose, no caso dos hepatócitos, ou manose, no caso dos macrófagos, e ainda proteínas como a transferrina, que adicionada a lipoplexos mostrou aumentar o processo de transfecção em vários tipos de células (Simões et al., 2003).

As características físico-químicas do material a ser internalizado, nomeadamente o tamanho, são determinantes tanto no que respeita à via de internalização preferencialmente utilizada como ao subsequente destino das nanopartículas no interior das células. Deste modo, partículas de tamanhos inferiores a 200 nm são normalmente internalizadas por endocitose mediada por clatrina e chegam rapidamente ao lisossoma, enquanto as partículas com tamanhos entre 200 e 1000 nm são internalizados por endocitose mediada por cavéolos e não chegam ao lisossoma, o que, por si, pode constituir um fator favorável ao aumento de eficiência de transfecção (Simões et al., 2005). De facto, se, após a sua internalização, o material genético não for libertado do endossoma para o citoplasma, o risco de que seja degradado ao nível dos lisossomas é grande e a probabilidade de que seja

libertado incólume no citoplasma é muito pequena (Fig. 7). Desta forma, várias estratégias têm vindo a ser desenvolvidas no sentido de promover a libertação dos ácidos nucleicos a partir do endossoma. Neste contexto, DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) assume um papel importante, uma vez que é capaz de adotar uma estrutura hexagonal invertida ao pH do endossoma. Sendo este pH muito inferior ao pK do grupo amínico primário da etanolamina, PE adquire um carácter de *zwitterião* (eletricamente neutro) e estabelece ligações de hidrogénio intermoleculares, o que, aliado à presença de cadeias insaturadas (ácido oleico em DOPE), lhe confere uma geometria compatível com a formação de fases hexagonais II. A formação destas estruturas, que têm sido associadas a fenómenos de fusão membranar, cria instabilidade na membrana dos endossomas, favorecendo, assim, a libertação do material genético (Simões et al., 2005). No caso do material genético transportado ser DNA, para que seja transcrito terá ainda de atravessar a membrana nuclear, o que pode ocorrer de forma passiva durante a divisão celular ou por transporte ativo através da membrana nuclear (Tros de Ilarduya et al., 2010).

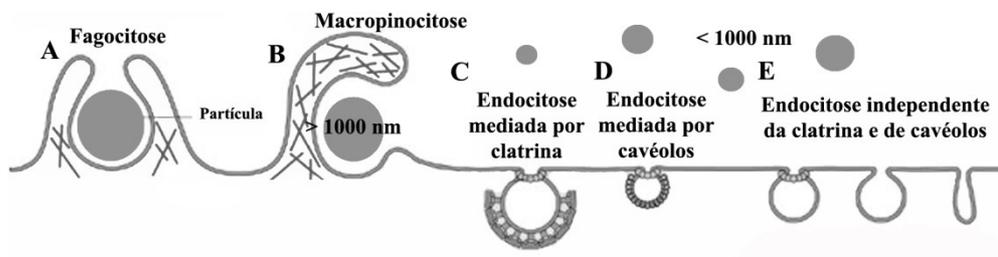


Figura 6 – Principais vias de endocitose. A endocitose pode ocorrer por fagocitose (A) ou por pinocitose, onde se incluem a macropinocitose (B), a endocitose mediada por clatrina (C), a endocitose mediada por caveólos (D) e a endocitose independente da clatrina e de caveólos (E) (adaptado de Lopez e Arias, 2010).

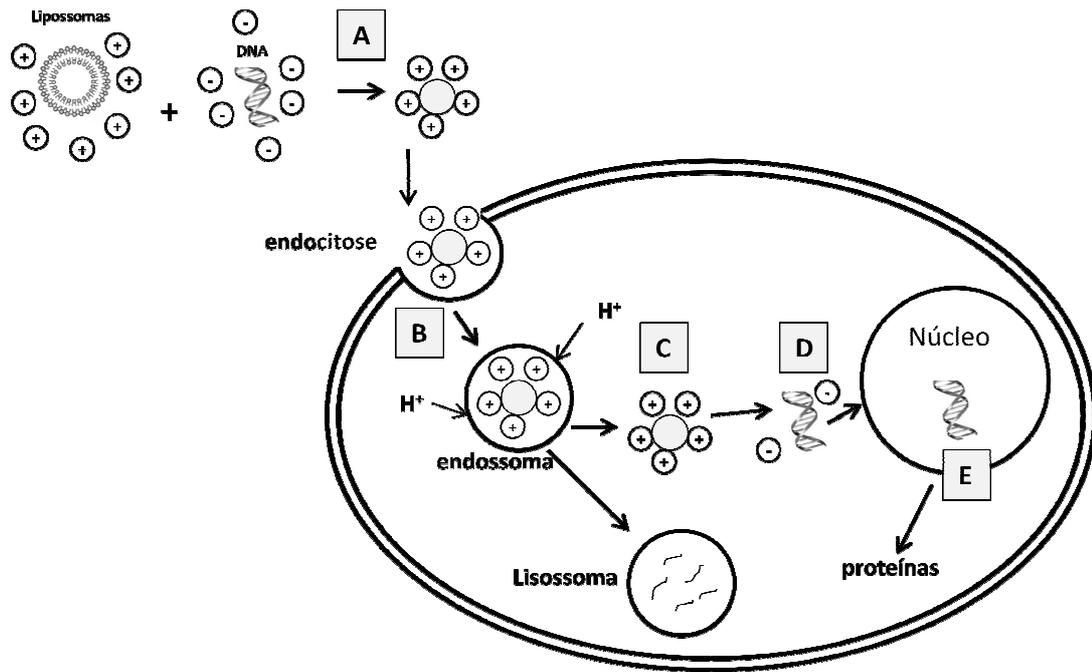


Figura 7 – Barreiras biológicas que têm de ser ultrapassadas para o material genético (DNA) alcançar o núcleo em células-alvo. Para que o processo seja bem sucedido, o complexo preparado a partir do vetor e do material genético, por exemplo lipossomas e DNA (A), estabilizado por interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas, terá de entrar na célula (B), normalmente por endocitose, e escapar do endossoma (C). O vetor terá de libertar o material genético de forma adequada no citoplasma, de preferência próximo do núcleo (D), de forma que o DNA entre no núcleo e seja transcrito (E), dando lugar à expressão de uma proteína (adaptado de Wong et al., 2007).

Muitos têm sido os vetores desenvolvidos com vista a serem usados na terapia génica, distribuindo-se por dois grandes grupos: os vetores virais (retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados e lentivírus) e os vetores não-virais (entre os quais se destacam os constituídos por lípidos, polímeros e peptídeos).

Uma vez que os vírus se caracterizam pela capacidade de invadir e introduzir o material genético (DNA ou RNA) nas células hospedeiras, a terapia génica explorou e desenvolveu vetores virais com vista a promover a introdução do material genético nas células-alvo. Para esse efeito, os genes de vírus que estão envolvidos em mecanismos causadores da doença são removidos e os genes com o efeito terapêutico desejado são introduzidos. Os vetores virais a aplicar na terapia génica diferem entre si, desde logo pela natureza do material genético que possuem. O RNA está presente nos retrovírus e nos lentivírus enquanto o DNA de dupla hélice e o DNA de cadeia simples está presente nos

adenovírus e nos vírus adeno-associados, respetivamente. Por outro lado, uns conseguem transportar genes de maior dimensão e têm maior tendência para provocar reações inflamatórias (adenovírus) e outros têm a capacidade de se integrar no genoma das células, como os retrovírus e os lentivírus (Nathwani et al., 2005). Os vetores virais apresentam como principais vantagens a entrada eficiente nas células e a elevada expressão do gene transportado. No entanto, existem também algumas limitações na utilização destes sistemas na terapia génica, começando pela dificuldade na sua produção em grande escala. Por outro lado, a integração ao acaso do genoma do vírus no genoma do hospedeiro com risco de ativação de oncogenes (no caso dos retrovírus) e a indução de resposta imunitária (no caso do adenovírus) são dois grandes obstáculos à aplicação terapêutica de sistemas virais (Kikuchi et al., 1999).

Do mesmo modo que os sistemas terapêuticos de natureza viral, os sistemas não-virais têm vantagens e desvantagens na sua utilização. Destacam-se como vantagens a simplicidade de preparação, a segurança que oferecem na utilização em seres humanos, a capacidade de transportarem diferentes tipos de material genético, a ausência de imunogenicidade, a possibilidade de administração sistémica, a facilidade com que podem ser modificados de modo a alcançarem células ou tecidos específicos, e finalmente, os menores custos que comporta a sua produção relativamente a vetores virais. Como principais desvantagens apontam-se o baixo nível de expressão genética e o carácter transiente da expressão, que obriga, no caso de tratamento de doenças crónicas, a administrações repetidas (Kikuchi et al., 1999; Al-Dosari e Gao, 2009).

Muitos dos nanomateriais utilizados na entrega de fármacos, entre os quais se contam, como referido atrás, lipossomas, polímeros, peptídeos com a capacidade de atravessarem a membrana (CPP, na designação anglo-saxónica *Cell Penetrating Peptide*), bem assim como nanomateriais de carbono (fulerenos e nanotubos de carbono), têm vindo a ser estudados como possíveis vetores de material genético. Do ponto de vista químico, as nanopartículas de carbono, em que se centrarão os estudos realizados no âmbito deste trabalho de tese, oferecem a vantagem de poderem ser facilmente funcionalizados, dando lugar a nanomateriais com diferentes tamanhos, estruturas e composição química, com propriedades físico-químicas e também atividade biológica distintas (Katragadda et al., 2010). Neste contexto, Nakamura e colaboradores (2000), pioneiros na investigação do potencial dos fulerenos para o transporte de ácidos nucleicos, sintetizaram um derivado de fulereno catiónico com duas cadeias laterais diamínicas que se encontravam separadas por uma distância (1,2 nm) pressupostamente ideal para interagir com os dois grupos fosfato

que flanqueiam o sulco maior de DNA. Este composto tetracatiônico revelou a capacidade de condensar o plasmídeo de DNA em partículas de fulereno-DNA com dimensões micrométricas por um processo que seria potenciado sinergisticamente pelos grupos carregados positivamente das cadeias laterais e a extensa região hidrofóbica do fulereno. Estes complexos foram internalizados por endocitose em células COS-1 e promoveram a expressão do gene introduzido, revelando que o plasmídeo teria sido libertado, embora por um mecanismo ainda mal esclarecido. A eficiência de transfecção com estes complexos foi semelhante à de um reagente comercial (Lipofectin[®]). Nanotubos de carbono revelaram-se também eficazes na entrega de siRNA a células T humanas, silenciando os recetores CD4 e CXCR4 necessários à entrada do vírus que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida humana (Liu et al., 2007).

1.4 Objetivos do trabalho

O presente trabalho expõe uma investigação sistemática da interação de fulerenos com sistemas biológicos com o objetivo de prever a influência do tamanho, da química superficial e da carga que as nanopartículas de fulereno adquirem em dispersões aquosas na sua atividade biológica, encarando esta sob duas perspetivas: toxicológica e farmacológica. Com este propósito, dois fulerenos, C₆₀ e um seu derivado poli-hidroxiado C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, foram selecionados por apresentarem diferenças na química superficial e na polaridade e por se encontrarem disponíveis comercialmente com elevados níveis de pureza.

São objetivos específicos deste trabalho:

1. Desenvolver uma metodologia para preparar suspensões aquosas estáveis de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, livres de contaminantes tóxicos, e caracterizar fisicamente (no que respeita a dimensões e carga superficial) as nanopartículas em suspensão em meios tamponizados de diferente composição, preparados de forma a mimetizar as condições fisiológicas dos respetivos sistemas biológicos em estudo.
2. Avaliar a influência das características físico-químicas dos fulerenos na sua localização preferencial ao longo da espessura de bicamadas lipídicas e na extensão da partilha, utilizando modelos membranares de lípidos sintéticos (DPPC) e membranas nativas (mitocôndrias de fígado de rato);
3. Caracterizar os efeitos das suspensões aquosas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ na bioenergética mitocondrial, procurando estabelecer uma correlação entre a localização membranares e o coeficiente de partilha dos fulerenos entre as fases membranares e aquosa e o seu impacto numa atividade da célula fortemente influenciada pela estabilidade da membrana (membrana interna da mitocôndria);
4. Avaliar a ecotoxicidade das nanopartículas de fulerenos, considerando-se os efeitos no crescimento e na atividade respiratória de um organismo procariótico (bactéria *Geobacillus stearothermophilus*) e na proliferação vegetativa e na atividade fotossintética de um organismo eucariótico autotrófico (planta *Lemna gibba*), para caracterizar o risco ambiental associado à exposição dos fulerenos.

5. Estabelecer a relação entre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de fulerenos e a toxicidade para vários tipos de células animais no sentido de avaliar o seu potencial e determinar a gama de concentrações passíveis de serem utilizadas em aplicações biomédicas;
6. Avaliar e comparar a ação protetora dos dois fulerenos face ao stresse oxidativo induzido por um agente oxidante e lesivo da função mitocondrial, o *t*-butil-hidroperóxido, tanto em células animais, opondo-se à perda de viabilidade das células, como ao nível da membrana (de mitocôndrias isoladas de tecido animal), contrariando a peroxidação lipídica;
7. Avaliar a aplicabilidade das nanopartículas de fulerenos como vetores de ácidos nucleicos em células animais com o fim de conceber agentes terapêuticos capazes de promover o silenciamento ou a expressão de uma proteína-alvo, conferindo simultaneamente proteção contra o dano oxidativo associado a inúmeras doenças (*e.g.* doença de Alzheimer).

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os fulerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$, com um grau de pureza mínimo de 99,5%, foram obtidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) e de Buckyusa (Houston, Tx), respectivamente. As sondas fluorescentes, ácido 16-(9-antróiloxi)-palmítico (16-AP) e ácido 2-(9-antróiloxi)-esteárico (2-AS), foram fornecidos por Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). Os lípidos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc. (Murcia, Spain). O siRNA que silencia a GFP, *Green Fluorescent Protein*, 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3', e o siRNA que não silencia esta proteína foram obtidos da Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Os restantes reagentes, todos de grau analítico, foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO).

2.2 Preparação de suspensões aquosas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$

A suspensão aquosa de C_{60} foi preparada por transferência das nanopartículas de fulereno solubilizadas em tolueno para a fase aquosa com recurso a sonicação moderada de acordo com o método descrito por Andrievsky e colaboradores (2002), com algumas modificações. Assim, 4 mg de C_{60} foram adicionadas a 2 ml de tolueno e a mistura foi agitada em vórtice durante alguns minutos originando uma solução de cor roxa intensa. Esta solução foi depois adicionada a 100 ml de água e a mistura agitada vigorosamente para promover a formação de uma emulsão de tolueno em água. A mistura foi submetida a ultrassons em banho de água (Bandelin, Sonorex RK 100H) à temperatura ambiente durante, pelo menos, 24 horas para remover o tolueno e promover a transferência das nanopartículas para a fase aquosa. A mistura foi filtrada por pressão reduzida através de um filtro de nitrato de celulose com poro de 450 nm para remover o material sólido e os aglomerados de partículas suspensas com tamanho médio superior. A suspensão coloidal filtrada foi transferida para um balão de fundo redondo e o solvente foi evaporado num evaporador rotatório sob vácuo a 50 °C até reduzir o solvente a metade, para remover eventuais vestígios de tolueno e concentrar a amostra. O espectro UV/vis da suspensão aquosa de C_{60} foi obtido num espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 45), medindo a

absorvência no intervalo entre 200 a 700 nm, com a resolução de 1 nm e a velocidade de varrimento de 60 nm/min, para detetar as bandas de absorção características do C₆₀ (máximos de 262 e 343 nm) e determinar a concentração das nanopartículas, considerando que o coeficiente de absorvidade molar (ϵ), a 343 nm, e C₆₀ em água é 68000 dm³.mol⁻¹.cm⁻¹ (Andrievsky et al., 2002). A solução foi preservada no escuro à temperatura ambiente.

Para avaliar se quantidades vestigiais de tolueno ficaram retidas na amostra, retirou-se 2 ml de cada uma das suspensões aquosas de C₆₀ e procedeu-se a uma microextração em fase sólida (*SPME - Solid Phase Micro-Extraction*), sob agitação magnética, durante 30 minutos a 40 °C, como previamente descrito por Lee e colaboradores (2007). Os compostos voláteis retidos na microfibras (75 µm Carboxeno-polidimetilsiloxano) foram analisados num cromatógrafo gás-líquido Thermo Finningan: Trace GC ligado a um espectrómetro de massa Q Polaris MSn equipado com um analisador Ion Trap, promovendo a desadsorção a 290 °C durante 2 minutos. Esta metodologia não permitiu detetar tolueno nas suspensões aquosas de C₆₀, pelo que podemos afirmar que a concentração de tolueno é inferior a 0,1 ng/ml, isto é, o limite de deteção determinado pela metodologia usando uma série de soluções/suspensões de tolueno e água com concentrações conhecidas.

A suspensão coloidal aquosa de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ foi preparada adicionando 68 mg de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ a 100 ml de água desmineralizada. A mistura foi agitada por sonicação moderada durante 4 horas, obtendo-se um líquido transparente com uma cor amarelada sem qualquer resíduo sólido. A solução foi preservada no escuro à temperatura ambiente.

2.3 Caracterização das suspensões aquosas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂: dimensões e carga superficial

O tamanho das nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ nas suspensões aquosas foi avaliado pela medição da dispersão dinâmica de luz (DLS, na designação anglo-saxónica *Dynamic Light Scattering*,) resultante dos movimentos Brownianos das nanopartículas em suspensão por espectroscopia de correlação de fótons (Brookhaven Instruments Corp., Zeta Plus). Este equipamento, através do *software* associado, permite determinar o diâmetro médio e o potencial Zeta das partículas em suspensão medindo a sua mobilidade eletroforética após a aplicação de um campo elétrico (Brant et al., 2006). O tamanho e a carga superficial em termos de potencial Zeta das nanopartículas em suspensão foram avaliados, a 25 °C, usando um laser Hélio/Néon a 658 nm como fonte de emissão e o detetor orientado perpendicularmente (90°) à direção de emissão da luz.

2.4 Avaliação do efeito dos fulerenos na bioenergética mitocondrial

2.4.1 Isolamento das mitocôndrias de fígado de rato

As mitocôndrias de fígado foram isoladas de ratos da estirpe Wistar (machos), com a idade próxima dos 56 dias (8 semanas). Nas 12 horas anteriores à sua utilização os ratos foram mantidos em jejum, com água *ad libitum*, para esgotarem as reservas de glicogénio e reduzirem as reservas de gordura acumuladas no fígado, evitando a contaminação da fração mitocondrial com estes compostos. A fração mitocondrial foi isolada a partir do fígado do rato, de acordo com o método descrito por Gazotti e colaboradores (1979), com algumas modificações. Assim, o rato foi morto por deslocamento cervical e imediatamente decapitado para sangrar rapidamente. O fígado foi extraído e colocado em meio de homogeneização constituído por sacarose 250 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, Hepes 10 mM e albumina sérica bovina (BSA) deslipídada a 0,1% (pH 7,4), a cerca de 4 °C. O fígado foi cortado em pequenos pedaços e lavado com meio de homogeneização de forma a remover o excesso de sangue. O tecido em meio de homogeneização foi transferido para um homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” com um pistão de teflon e

homogeneizado a cerca de 250 rotações por minuto. Todo este procedimento foi realizado sobre gelo granulado, para manter a temperatura entre os 0 e os 4 °C. Durante o processo de homogeneização o tecido de fígado foi desintegrado, resultando numa suspensão constituída por fragmentos de células, células intactas, organelos intracelulares e alguns eritrócitos.

O homogeneizado foi centrifugado a 800 g durante 10 minutos, numa centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B), à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos de centrífuga (previamente arrefecidos em gelo) e centrifugado a 10000 g, durante 10 minutos, a 4 °C para obter a fração mitocondrial. O sedimento foi ressuspensão num pequeno volume de meio de lavagem constituído por sacarose 250 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2) e centrifugado novamente a 10000 g durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez e o sedimento obtido (fração mitocondrial purificada) foi ressuspensão num pequeno volume de meio de lavagem com um homogeneizador de vidro, previamente arrefecido em gelo. A preparação mitocondrial foi mantida à temperatura de 4 °C e utilizada durante um período de 6 horas.

2.4.2 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína da preparação mitocondrial foi determinada pelo método colorimétrico do biureto (Gornall et al., 1949). Este método baseia-se na reação do reagente de biureto, o qual é constituído por uma mistura de cobre e hidróxido de sódio na presença de um agente complexante que estabiliza o cobre em solução. O cobre, em meio alcalino reage com as ligações peptídicas das proteínas, formando um complexo de geometria quadrangular plana, de cor violeta com um pico de absorção a 540 nm. Alíquotas da suspensão de mitocôndrias e da suspensão de protoplastos (50 µl) foram solubilizadas pela adição de 50 µl de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10%. A cada uma destas misturas adicionou-se água desmineralizada até perfazer um volume de 500 µl e, em seguida, adicionaram-se 2 ml de reagente de biureto (CuSO₄.5H₂O 0,15%, NaKC₄H₄O₆.4H₂O 0,6%, NaOH 3% e KI 0,1%). Em simultâneo, preparam-se padrões de albumina sérica bovina (BSA) (0 – 2,4 mg) nas mesmas condições das amostras. Após 15 minutos de reação, mediu-se a absorvência das amostras e dos padrões a 540 nm, num espectrofotómetro Bausch & Lomb, Spectronic 21.

2.4.3 Avaliação da atividade respiratória das mitocôndrias

A atividade respiratória das mitocôndrias foi avaliada pelo consumo de oxigênio numa câmara de reação fechada com agitação magnética, termostaticada a 30 °C, com a capacidade de 1 ml. O consumo de oxigênio foi avaliado com um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Estabrook, 1967) ligado a um registrador Kipp & Zonen. O eletrodo foi calibrado à temperatura de 30 °C, considerando que a esta temperatura a concentração do oxigênio capaz de saturar a água ou o meio de reação é de 232 nmol O₂/ml.

As reações iniciaram-se por adição da suspensão mitocondrial (1 mg de proteína) a 1 ml de meio de respiração constituído por sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, KCl 20 mM, K₂HPO₄ 5 mM e MgCl₂ 2 mM (pH 7,2). A adição de substratos respiratórios (glutamato 10 mM + malato 5mM, ou succinato 10 mM) induziu um pequeno aumento no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. O estado respiratório 3 foi iniciado pela adição de 150 nmol de ADP. Após o consumo de todo o ADP adicionado, a velocidade de consumo de oxigênio decresce, iniciando-se o estado 4 da respiração. O índice de controlo respiratório foi avaliado como o quociente entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e a velocidade respiratória após o consumo do ADP adicionado, como descrito por Chance e Williams (1956). O meio de respiração foi suplementado com rotenona 2 μM, inibidor específico do complexo I, quando se ativou a respiração a partir do complexo II com o succinato. Para avaliar o efeito dos fulerenos na atividade respiratória, os fulerenos foram incubados com a suspensão mitocondrial durante 5 minutos antes da adição dos substratos respiratórios.

A respiração mitocondrial dissociada da fosforilação foi avaliada na presença dos dois substratos respiratórios, com posterior adição de FCCP (2 μM), um ionóforo para protões que dissocia energeticamente as mitocôndrias (Heytler, 1979). Os ensaios de respiração dissociada da fosforilação tiveram por objetivo avaliar os efeitos diretos dos fulerenos no transporte de eletrões através da cadeia respiratória.

2.4.4 Determinação do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) da mitocôndria

O potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) da mitocôndria foi avaliado pelo registo contínuo da distribuição do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP^+) através da membrana mitocondrial. Para o efeito, utilizou-se um eléctrodo seletivo para TPP^+ , preparado no nosso laboratório, de acordo com Kamo e colaboradores (1979). Como referência externa foi utilizado um eléctrodo de calomelanos (Ag/AgCl -saturado). Ambos os eléctrodos foram ligados a um aparelho de pH Crison 501 e o sinal correspondente à diferença de potencial gerada entre os eléctrodos, resultante da entrada de TPP^+ na mitocôndria, foi registada por um registador Linear 1200, após ter passado por um circuito de compensação de voltagem basal (Madeira et al., 1974).

Antes da determinação do potencial elétrico transmembranar das mitocôndrias, procedeu-se a uma avaliação do estado funcional dos eléctrodos. Assim, estudou-se a relação entre o potencial elétrico e a concentração de TPP^+ . Foram utilizados apenas os eléctrodos que apresentaram uma correlação linear com o logaritmo da concentração de TPP^+ , com um declive de 59 ± 1 mV por década de concentração de TPP^+ , à temperatura de 25 °C, em conformidade com o previsto pela equação de Nerst. O estado funcional dos eléctrodos utilizados foi também avaliado na presença de ambos os fulerenos para excluir a possibilidade de interferência direta com o eléctrodo.

Os ensaios foram realizados numa câmara de reação aberta sob agitação magnética contínua, termostaticada a 30 °C, em 1 ml de meio de reação (sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, KCl 20 mM, K_2HPO_4 5 mM e MgCl_2 2 mM, pH 7,2) suplementado com 3 μM de TPP^+ e 1 mg de proteína mitocondrial. Os registos foram iniciados após a adição dos substratos respiratórios, glutamato 10 mM/malato 5 mM ou succinato 10 mM. As oscilações do potencial transmembranar da mitocôndria associadas ao estado respiratório 3 foram também avaliadas pela adição de 150 nmol de ADP. Quando se ativou a cadeia respiratória com succinato, o meio de respiração foi suplementado com rotenona (2 μM). Para avaliar o efeito dos fulerenos no potencial elétrico transmembranar da mitocôndria, os fulerenos (7 a 20 nmol de C_{60} /mg de proteína mitocondrial e de 5 a 94 nmol de $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18-22}$ /mg de proteína mitocondrial) foram incubados com a suspensão mitocondrial durante 5 minutos antes da adição dos substratos respiratórios.

O potencial transmembranar mitocondrial foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\Psi \text{ (mV)} = 59 \log\left(\frac{v}{V}\right) - 59 \log\left(10^{\frac{\Delta E}{59}} - 1\right) \quad [1]$$

onde v representa o volume mitocondrial, V o volume do meio de incubação e ΔE a deflexão do potencial do elétrico desde a linha basal (Kamo et al., 1979). Para o volume de matriz mitocondrial considerou-se o valor de 1,1 $\mu\text{l/mg}$ de proteína (Masini et al., 1984).

2.4.5 Avaliação da atividade da F_0F_1 -ATPase

A F_0F_1 -ATPase, também conhecida como complexo V do sistema respiratório mitocondrial, é composta por duas subunidades: a) a subunidade F_0 , constituída por 4 tipos de cadeias polipeptídicas, é um segmento hidrofóbico que atravessa a membrana interna da mitocôndria formando um canal para prótons; b) a subunidade F_1 , constituída por 5 tipos de cadeias polipeptídicas, é a componente catalítica do complexo enzimático que sintetiza ATP a partir de fosfato inorgânico e ADP utilizando o gradiente eletroquímico transmembranar de prótons gerado pela cadeia respiratória (Guerrieri et al., 1990). Esta enzima também é capaz de clivar ATP para gerar um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana e, neste caso, é designada por F_0F_1 -ATPase. A clivagem de ATP liberta prótons. Então, a atividade da F_0F_1 -ATPase foi avaliada por um método potenciométrico (eléctrodo de pH) como descrito por Madeira e colaboradores (1974), registando continuamente as variações de pH no meio de ensaio.

A reação ocorreu numa câmara de reação aberta, termostatizada a 30 °C, sob agitação magnética contínua, em 2 ml de meio de reação (sacarose 130 mM, KCl 60 mM, HEPES 0,5 mM, MgCl_2 2,5 mM, pH 7,0), suplementado com rotenona (3 μM) e 1 mg de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de Mg-ATP (2 mM) e a libertação de prótons foi continuamente registada por um eléctrodo de pH ligado a um aparelho de pH, Crison 501, conectado a um registador Kipp & Zonen. Três minutos após o início do registo, foi adicionado ao meio de reação 1 μg de oligomicina (um inibidor específico da F_0F_1 -ATPase), que aboliu por completo a produção de prótons. A calibração interna do

sistema foi efetuada, no final de cada ensaio, por adição de quantidades convenientes de uma solução padrão de HCl.

Para avaliar o efeito dos fulerenos na atividade da F_0F_1 -ATPase, os fulerenos (7 a 20 nmol de C_{60} /mg de proteína mitocondrial e de 5 a 94 nmol de $C_{60}(OH)_{18-22}$ /mg de proteína mitocondrial) foram incubados com a suspensão mitocondrial durante 5 minutos antes da adição do Mg-ATP.

2.5 Estudos de fluorescência: Determinação da localização e da partilha dos fulerenos nas membranas

2.5.1 Preparação de lipossomas unilamelares de DPPC

Os lipossomas unilamelares de DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina) foram obtidos a partir de lipossomas multilamelares por extrusão de acordo com o método descrito por Videira e colaboradores (2001). Assim, o lípido necessário para obter a concentração final requerida foi dissolvido em 5 ml de clorofórmio num balão de fundo redondo e o solvente evaporado, sob vácuo, num evaporador rotatório, de forma a obter uma película fina e homogénea de lípido na parede do balão. Após a remoção do solvente, a preparação permaneceu sob vácuo, no evaporador rotatório, durante 10 minutos de forma a garantir a máxima remoção de resíduos de clorofórmio. O lípido foi hidratado com o volume requerido de solução tampão (Tris-maleato 10 mM, KCl 50 mM, pH 7,0) previamente aquecida a 50 °C. O balão foi mergulhado num banho termostaticado à temperatura de 50 °C (9 °C acima da temperatura de transição de fase do DPPC) e agitado à mão de forma a remover o lípido da parede do balão e obter os lipossomas multilamelares de DPPC. A suspensão de lipossomas foi passada treze vezes por duas membranas de policarbonato, com poros de 200 nm de diâmetro, montados num extrusor manual de modo a obter uma população homogénea de lipossomas unilamelares com um diâmetro médio de 200 ± 10 nm, avaliado pela medição da dispersão dinâmica de luz (DLS, na designação anglo-saxónica *Dynamic Light Scattering*), como descrito para as suspensões aquosas dos fulerenos.

A concentração de fosfolípidos na suspensão de lipossomas recolhida (stock) foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico (Bartlett, 1959), após hidrólise ácida dos fosfolípidos (Böttcher et al., 1961). Assim alíquotas da suspensão de lipossomas e de uma solução padrão de KH_2PO_4 (0-250 nmol) foram transferidas para tubos de *pyrex* e o solvente (água) foi evaporado à chama do bico de Bunsen. Foram adicionados 0,5 ml de ácido perclórico a 70% a cada um dos tubos contendo os lipossomas ou os padrões de fosfato. Os tubos foram tapados com esperas de vidro e colocados num bloco de alumínio termostaticado, à temperatura de 180 °C, durante 2 horas, para promover a hidrólise dos fosfolípidos. O ácido perclórico vaporizado no fundo do tubo condensa na parede dos tubos expostos ao ar e mantém-se assim um refluxo contínuo de ácido perclórico sem perdas para o exterior. A cada um dos tubos, arrefecidos à temperatura ambiente, foram adicionados 7,5 ml de uma solução de molibdato de amónio (molibdato de amónio a 0,22% em ácido sulfúrico a 2%) e, após agitação, 0,3 ml de reagente de Fiske-Subbarow (NaHSO₃ a 15%, Na₂SO₃ a 0,5% e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico a 0,25%) (Fiske e Subbarow, 1925). Os tubos foram agitados sob vórtice, tapados com as esferas de vidro e colocados num banho de água a ferver durante 15 minutos. Observou-se o desenvolvimento de uma cor azul devido à formação do complexo de fosfomolibdato reduzido. A absorvência dos lipossomas e dos padrões de fosfato, depois de arrefecidos à temperatura ambiente, foi determinada num espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 21, a 830 nm. Os valores de fosfato inorgânico foram determinados a partir da curva padrão de fosfato obtida com os padrões.

2.5.2 Preparação e incorporação das sondas nas membranas

As sondas ácido 16-(9-antioiloxi)-palmítico (16-AP) e ácido 2-(9-antioiloxi)-esteárico (2-AS) foram dissolvidas em dimetilformamida de forma a obter soluções relativamente concentradas (2 mM) para que pequenos volumes das mesmas pudessem ser injetados nas suspensões membranares.

Alíquotas das soluções concentradas de sonda (1,25 µl) foram adicionadas, sob agitação em vórtice, a 2,5 ml de suspensões membranares (lipossomas unilamelares ou mitocôndrias) contendo uma concentração de lípido que variou entre 100 e 600 µM para o DDPC e entre 50 a 200 µM para as suspensões mitocondriais, de forma a obter uma

concentração “*bulk*” de sonda de 1 μM e uma diminuição progressiva da razão molar sonda/lípido de 1/100 a 1/600. Neste intervalo de razões molares sonda/lípido, as sondas exibem elevada intensidade de fluorescência sem induzirem alterações significativas nas propriedades biofísicas das membranas lipídicas (Cadenhead et al., 1977; Videira et al., 1999). As misturas foram incubadas durante 2 horas, protegidas da luz, sob agitação magnética, à temperatura de transição de fase do DPPC (41 °C) ou a 30 °C quando se usaram mitocôndrias, para garantir a completa incorporação da sonda nas membranas.

Os fulerenos foram adicionados, a partir de suspensões aquosas concentradas, às suspensões de membranas contendo a sonda fluorescente de modo a obter as concentrações molares de fulerenos indicadas nas figuras. As preparações foram incubadas nas mesmas condições descritas para as sondas, durante 30 minutos, antes do registo do espectro de fluorescência. Para cada amostra (suspensão membranar contendo sonda e fulereno) foi preparado um controlo (suspensão membranar contendo apenas sonda) e um testemunho ou branco contendo o volume equivalente de suspensão membranar sem sonda mas com a mesma concentração do fulereno e com o volume correspondente do solvente da sonda. As amostras, controlo e brancos sofreram igual tratamento. Os brancos foram utilizados na correção das medições fluorimétricas para descontar o contributo da luz dispersa pelas partículas em suspensão (“*light scattering*”). Nas condições experimentais utilizadas, a luz dispersa manteve-se sempre com valores baixos, inferiores a 0,5% da intensidade de fluorescência.

2.5.3 Determinação da localização e da partilha dos fulerenos nas membranas por fluorescência

Na espectralfluorimetria foram usadas duas sondas membranares, o ácido 16-(9-antioiloxi)-palmítico (16-AP) e o ácido 2-(9-antioiloxi)-esteárico (2-AS). Estas sondas ficam ancoradas à superfície polar da membrana pelo grupo carboxílico que, a pH 7, apresenta carga negativa. Assim, cada sonda apresenta o fluoróforo (antraceno) a uma profundidade distinta na membrana: a 16-AP no interior hidrofóbico da membrana e a 2-AS próximo das regiões polares da bicamada lipídica (Cadenhead et al., 1977; Videira et al., 1999).

A capacidade dos fulerenos em suprimirem de um modo distinto a emissão de fluorescência das sondas 16-AP e 2-AS incorporadas em membranas foi usada para estimar a sua localização preferencial ao longo da espessura da bicamada lipídica e para selecionar a sonda usada nos estudos de partilha. O coeficiente de partilha de cada um dos fulerenos entre a fase aquosa e a fase membranar foi determinado utilizando a sonda cuja intensidade de emissão de fluorescência foi mais suprimida pela presença do fulereno.

Os espectros de emissão de fluorescência da sonda 2-AS e da sonda 16-AP incorporadas nas membranas de DPPC ou de mitocôndrias, na ausência e na presença de diferentes concentrações de fulerenos, foram obtidos num espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies) equipado com um bloco para termostatização de cuvetes e em sistema automático de agitação magnética. Para ambas as sondas, os espectros de emissão de fluorescência, no intervalo 390 e 550 nm, foram obtidos com a excitação a 365 nm. As bandas de excitação e de emissão foram ambas de 5 nm. A velocidade de aquisição de dados foi de 60 nm/min com a resolução de 0,1. Com as membranas de DPPC, os ensaios foram realizados à temperatura de $50 \pm 0,1$ °C (fase fluída) e com as mitocôndrias, a $37 \pm 0,1$ °C, próximo da temperatura fisiológica do animal. Todas as medições de fluorescência foram corrigidas para eliminar os efeitos de dispersão de luz pelas membranas, registando o espectro de brancos (sem sonda), preparados como previamente descrito.

Os coeficientes de partilha lípido-água foram determinados através da equação modificada de Stern-Volmer (Fato et al., 1986; Santos et al., 2003):

$$\frac{1}{K_{ap}} = \alpha_m \left(\frac{1}{K_q} - \frac{1}{K_q K_p} \right) + \frac{1}{K_q K_p} \quad [2]$$

onde K_{ap} é a constante aparente de Stern-Volmer (determinada experimentalmente pelas representações gráficas de Stern-Volmer, isto é, razão entre a intensidade de fluorescência da sonda na ausência de fulerenos e a intensidade de fluorescência da sonda na presença de fulerenos (F_0/F) em função da concentração molar de fulerenos), α_m é o volume da fração membranar, K_q é a constante de supressão de fluorescência (“*quenching*”) do fulereno na membrana e K_p é o coeficiente de partilha. Assim, da representação gráfica de $1/K_{ap}$ em função de α_m obtém-se uma reta em que o interceto na origem corresponde a $1/K_q K_p$ e o declive a $(1/K_q - 1/K_q K_p)$, permitindo determinar os coeficientes de partilha (K_p) dos fulerenos entre a fase aquosa e a fase membranar. O volume da fração membranar (α_m) foi

determinado assumindo que o volume específico do lípido é 0,984 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de fosfolípido (White et al., 1987). A quantidade de fosfolípidos nas membranas foi avaliada pela quantificação do fosfato inorgânico (Bartlett, 1959), após hidrólise ácida dos fosfolípidos (Böttcher et al., 1961) extraídos pelo método de Bligh e Dyer (1959), como previamente descrito. Para calcular o volume membranar, assumiu-se que a massa molecular média dos fosfolípidos mitocondriais é 777 g/mol.

2.6 Avaliação do efeito dos fulerenos na oxidação lipídica de membranas mitocondriais induzida por *t*-butil-hidroperóxido

O ácido 9,11,13,15-octadecatetraenóico (cis-parinárico), devido às suas quatro ligações duplas conjugadas é uma molécula fluorescente quando inserido em ambientes apolares (*e.g.* membranas biológicas). Tal como os ácidos gordos insaturados dos fosfolípidos membranares, o cis-parinárico também é sensível à oxidação, sendo a sua degradação considerada um sinal das etapas iniciais da oxidação lipídica do sistema membranar no qual foi incorporado. Portanto, a diminuição da intensidade de fluorescência da sonda associada à degradação oxidativa das suas ligações duplas pode ser acompanhada por espectrofluorimetria, como previamente descrito (Laranjinha et al., 1992; Dinis et al., 1994). Para avaliar os efeitos dos fulerenos na proteção da oxidação dos lípidos membranares, utilizaram-se mitocôndrias de fígado de rato e *t*-butil-hidroperóxido como agente oxidante. Assim, 2,5 μl de uma solução etanólica concentrada de cis-parinárico (1,5 mM) foram adicionados a uma célula de quartzo contendo 2,5 ml de meio de reação (KCl 50 mM, Hepes 5 mM, pH 7,2) suplementado com 0,5 mg de proteína mitocondrial. A mistura foi incubada durante cinco minutos, à temperatura de 30 °C, sob agitação magnética suave, para que a sonda incorporasse nas membranas das mitocôndrias antes de se iniciar o registo. Dois minutos após o início do registo, a degradação oxidativa foi induzida pela adição de 25 μl de *t*-butil-hidroperóxido a 70% (Sigma Chemical Co.) e o decréscimo da intensidade de fluorescência foi acompanhado, durante 5 minutos, num espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies). A excitação da sonda foi fixada a 324 nm e a emissão foi detetada a 413 nm, mantendo a largura de ambas as fendas (excitação e emissão) fixas a 5 nm. Ensaios para avaliar o efeito do aumento da

concentração de fulerenos foram efetuados utilizando o mesmo procedimento, tendo-se incubado as suspensões membranares após a incorporação da sonda com os fulerenos durante 5 minutos antes do início do registo. Para cada concentração de fulereno testada foi preparado um testemunho ou branco contendo o volume equivalente de suspensão membranares sem sonda mas com a mesma concentração do fulereno e com o volume correspondente do solvente da sonda. Os registos obtidos com os brancos foram utilizados na correção das medições fluorimétricas obtidas com as correspondentes amostras, eliminando os efeitos da dispersão de luz (*light scattering*) pelas partículas em suspensão e as possíveis interferências dos fulerenos.

Para comparação dos resultados, normalizou-se a intensidade de fluorescência, considerando para todos os ensaios unitária a fluorescência no momento da indução do processo oxidativo. Para cada ensaio, a percentagem relativa de cis-parinarico oxidado foi também determinada 6 minutos após o início do processo oxidativo e os resultados expressos como percentagem do controlo, isto é, o ensaio realizado na ausência de fulerenos.

2.7 Avaliação dos efeitos dos fulerenos na bactéria *Geobacillus stearothermophilus*

2.7.1 Cultura de *Geobacillus stearothermophilus* e preparação dos protoplastos

G. stearothermophilus (originalmente designado de *Bacillus stearothermophilus*), preservado em tubos de criopreservação a -80 °C, foi recultivado em caixas de Petri com meio “Tryptic Soy Broth” (dextrose 2,5 g/L, NaCl 5 g/L, K₂HPO₄ 2,5 g/L, peptona de caseína 17 g/L e peptona de soja 3 g/L) suplementado com 1,8% de agar, que, depois de inoculadas a partir de uma suspensão de células em 0,9% de NaCl foram incubadas à temperatura de 65 °C (temperatura ótima de crescimento da bactéria). As colónias isoladas do meio sólido foram usadas para inocular 50 ml de meio líquido fresco “L-Broth” (bactotripton 5 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L, NaCl 1,25 g/L, 2 ml de NaOH 1M e 1 ml de uma solução de cistina 100 mM em HCl 1 M) num erlenmeyer de 250 ml. As culturas do microrganismo em meio líquido foram efetuadas num incubador de banho termostatizado

(New Brunswick), com agitação em vaivém a 100 cursos por minuto, a 65 °C. O crescimento da bactéria foi acompanhado ao longo do tempo, avaliando a pseudo-absorvência ou densidade ótica, num espectrofotômetro Jenway 6405, a 610 nm. Quando o crescimento atingiu a fase logarítmica ou exponencial (pseudo-absorvência de cerca de 0,3), foi interrompido por transferência dos frascos de cultura para um banho de gelo e determinou-se o volume de inóculo ativo necessário para incubar novos meios líquidos, de modo a iniciarem-se todos os ensaios de crescimento com a densidade bacteriana correspondente a uma pseudo-absorvência de 0,03, a 610 nm. Esta metodologia foi utilizada para estudar o efeito dos fulerenos no crescimento de *G. stearothermophilus* e para obter microrganismos em quantidade suficiente para isolar os protoplastos.

Os protoplastos de *G. stearothermophilus* foram isolados a partir de culturas do microrganismo em meio L-Broth, a 65 °C em fase exponencial. As células foram lavadas e recolhidas por centrifugação, numa centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, a 6000 g, durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento (fração celular) foi ressuspensão em tampão Tris-Cl 40 mM (pH 7,5), contendo MgCl₂ 10 mM, e centrifugado a 17000 g durante 3 minutos, a 4 °C. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. O sedimento obtido foi ressuspensão em tampão (Tris-Cl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,5) contendo 0,3% de lisozima e colocado num banho termostatizado à temperatura de 37 °C, durante 45 minutos. A lisozima hidrolisa o peptidoglicano da parede celular das bactérias, especificamente as ligações β-glicosídicas entre o carbono 1 do ácido N-acetilmurâmico (NAM) e o carbono 4 da N-acetilglucosamina (NAG), levando à formação dos protoplastos (Wisdom e Welker, 1973). Após 45 minutos, os protoplastos foram recolhidos por centrifugação a 15000 g durante 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo os protoplastos foi ressuspensão em 1 ml de tampão Hepes 40 mM a pH 7,5, contendo MgCl₂ 10 mM. A densidade dos protoplastos na suspensão foi quantificada por determinação da concentração de proteína de acordo com o método anteriormente descrito.

2.7.2 Avaliação do crescimento de *Geobacillus stearothermophilus*

Alíquotas das suspensões aquosas de nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ foram adicionadas a 50 ml de meio de crescimento L-Broth num erlenmeyer de 250 ml de modo a obter a gama de concentrações entre 2 e 15 mg/L (para o C₆₀) e entre 5 e 200 mg/L (para o C₆₀(OH)₁₈₋₂₂). Um volume de inóculo ativo com a densidade bacteriana correspondente a uma pseudo-absorvência de 0,03 (a 610 nm), preparado de acordo com o método anteriormente descrito, foi adicionado ao meio de crescimento na ausência (cultura-controlo) ou na presença de fulerenos de modo a iniciar os crescimentos de *G. stearothermophilus*, à temperatura de 65 °C, num incubador de banho New Brunswick, com agitação vaivém a 100 cursos por minuto. Os crescimentos foram acompanhados ao longo do tempo pela leitura da pseudo-absorvência ou densidade ótica de alíquotas, retiradas a intervalos de tempo regulares do meio de crescimento, num espectrofotómetro Jenway 6405, a 610 nm. Para cada concentração de fulereno testada foi preparado um testemunho ou branco contendo o volume equivalente de fulerenos mas sem inóculo.

O crescimento bacteriano, definido como o aumento da massa celular ou do número de células de uma população num determinado intervalo de tempo, foi avaliado por turbidimetria. Durante o crescimento exponencial de uma cultura bacteriana, em que existem condições favoráveis de crescimento, o aumento do número de células de uma população, dN, num intervalo infinitesimal de tempo, dt, é proporcional à densidade instantânea da população, N:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad [3]$$

em que μ é designado de taxa específica de crescimento:

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad [4]$$

com a dimensão de tempo⁻¹. Integrando a equação no intervalo de tempo de t₀ a t

$$\int_{t_0}^t \frac{1}{N} dN = \int_{t_0}^t \mu dt \quad [5]$$

obtém-se a expressão:

$$\ln N_t - \ln N_0 = \mu(t - t_0) \quad \text{ou} \quad \ln N_t = \ln N_0 + \mu t \quad [6]$$

que corresponde à equação de uma reta ($y=mx+b$), em que t é a abcissa e $\ln N_t$ é a ordenada, com N_0 igual ao número de células no tempo zero. Dado que a pseudo-absorvência é proporcional ao número de células da cultura então:

$$N_t = kA_t \quad [7]$$

em que A_t representa a pseudo-absorvência da cultura ao tempo t e k , uma constante de proporcionalidade. Deste modo pode escrever-se:

$$\ln A_t = \ln A_0 + \mu t \quad [8].$$

A representação gráfica do crescimento bacteriano, $\ln A_t$ em função de t , permite determinar a taxa específica de crescimento (μ) pela inclinação da curva (declive) durante a fase exponencial.

2.7.3 Caracterização morfológica das células de *Geobacillus stearothermophilus*

As células de *G. stearothermophilus* cultivadas a 65 °C, em meio L-Broth na ausência (cultura-controlo) e na presença de 15 mg/L de C_{60} ou de 200 mg/L de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ foram caracterizadas por microscopia eletrónica utilizando as metodologias optimizadas no nosso laboratório (Jurado et al., 1987; Luxo et al., 2003). A meio da fase exponencial de crescimento, porções de 20 ml das culturas bacterianas foram recolhidas para frascos de centrífuga, previamente arrefecidos em gelo granulado e 2 ml de uma solução de gluteraldeído a 25% foram adicionados de imediato. As suspensões celulares foram centrifugadas a 10000 g durante 5 minutos numa centrífuga Sorvall RC-5B, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (fração celular) foi resuspenso numa solução de gluteraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7). Após um período de 4 horas em repouso a 4 °C, as células foram lavadas por duas vezes em 50 ml de tampão cacodilato de sódio suplementado com CaCl_2 10 mM (pH 6,4). As células foram posteriormente fixadas à temperatura ambiente, durante 2 horas, com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% (Silva e Macedo, 1983). Após fixação, as células foram desidratadas numa série graduada de etanol (70 – 100%) e embebidas numa resina de baixa viscosidade, Epon (Spurr, 1969). As amostras foram cortadas em secções ultrafinas com um ultra-micrótomo LKB Ultratome NOVA e contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo antes de analisadas por microscopia eletrónica. As observações e as micrografias foram realizadas num microscópio eletrónico de transmissão JEOL JEM-100 SX, a 80 kV.

2.7.4 Avaliação da atividade respiratória dos protoplastos de *Geobacillus stearothermophilus*

A atividade respiratória dos protoplastos de *G. stearothermophilus* foi avaliada pelo consumo de oxigênio, numa câmara de reação fechada com agitação magnética, termostaticada a 40 °C e com a capacidade de 1 ml. O consumo de oxigênio foi avaliado com um eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Estabrook, 1967) ligado a um registrador Kipp & Zonen. O eletrodo foi calibrado à temperatura de 40 °C, considerando que a esta temperatura a solubilidade do oxigênio em água ou em meio de reação é de 180 nmol O₂/ml. Os ensaios foram efetuados em 1 ml de meio da reação (Hepes–Tris 40 mM, MgCl₂ 10 mM, pH = 7,5) contendo a suspensão de protoplastos (0,1 mg de proteína), na ausência (controle) ou na presença de concentrações crescentes de fulerenos (C₆₀: 10 a 200 µg/mg de proteína; C₆₀(OH)₁₈₋₂₂: 65 a 2600 µg/mg de proteína). Após 5 minutos de incubação, as reações foram iniciadas por adição do substrato respiratório (NADH 5 mM) e o consumo de oxigênio acompanhado durante três minutos. A reação terminou com a adição de 3 µl de KCN 50 mM. A diferença entre o consumo de O₂ antes e após a adição de KCN foi usada para determinar a atividade respiratória dos protoplastos, expressa em nmol O₂/min/mg proteína.

2.8 Avaliação dos efeitos dos fulerenos na planta *Lemna gibba*

2.8.1 Cultura de *Lemna gibba* e isolamento de cloroplastos

Plantas de *Lemna gibba* foram recolhidas de uma pequena lagoa artificial, alimentada pela nascente de curso de água, situada no campus da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, e transferidas para um aquário contendo 5 L de meio de crescimento *Hutner's* (Brain e Solomon, 2007). O aquário contendo as lemnas foi transferido para uma câmara de crescimento com controlo de humidade, luminosidade e temperatura (Conviron mod. E7/2). As plantas cresceram à temperatura de 20 ± 2 °C sob $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*, na designação anglo-saxónica *Photosynthetic Active Radiation*), emitida por duas lâmpadas fluorescentes (Osram Sylvania), com um ciclo de iluminação de 16 h (Juhel et al., 2011). Nestas condições controladas, as plantas foram subcultivadas duas vezes por semana durante oito semanas antes de serem utilizadas nos estudos.

Os cloroplastos das plantas de *Lemna gibba* foram isolados de acordo com Babu e colaboradores (2001), com algumas modificações. Aproximadamente 35 g de plantas de *Lemna gibba* foram homogeneizadas em tampão de isolamento (sorbitol 345 mM, MgCl_2 5 mM, polyclar 1 g, tricine-NaOH 4 mM, pH 8) num homogeneizador (sterilmixer 12, poliBrand) durante 20 segundos (4 pulsos de 5 segundos cada), à temperatura de 4 °C. O homogeneizado obtido foi filtrado por 8 camadas de cheesecloth (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) e o filtrado recolhido foi centrifugado a 1500 g (Sigma 2K) durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, ressuspensão em cerca de 25 ml de tampão de isolamento, novamente centrifugado a 1500 g durante 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (cloroplastos isolados) foi ressuspensão em 1 ml de tampão de isolamento e conservado a 4 °C no escuro. Para evitar a peroxidação lipídica das membranas foram adicionados 30 μl de butil-hidroxitolueno (BHT) aos cloroplastos isolados. A densidade dos cloroplastos na suspensão foi quantificada por determinação do conteúdo em clorofilas, i.e. clorofila total (Chl *a* + Chl *b*).

2.8.2 Extração e determinação da concentração de clorofilas

As clorofilas foram extraídas dos cloroplastos isolados e das plantas intactas com uma solução de acetona/água (80:20, v/v). Os cloroplastos ou as plantas intactas foram homogeneizados num volume adequado de solução de extração com um homogeneizador tipo “Potter-Elvehjem”. Os homogeneizados obtidos foram incubados durante uma hora, sob agitação magnética, à temperatura de 4 °C e de seguida filtrados a pressão reduzida por filtros (Merck Millipore, USA) para remover o material biológico não solúvel. A absorvência dos extratos de clorofila foi medida a 663 e a 646 nm num espectrofotómetro Bio-Varian 100 (Agilent Technologies) e a concentração de clorofila *a* (Chl *a*), de clorofila *b* (Chl *b*) e de clorofila total (Chl *a* + Chl *b*) foram calculadas, de acordo com Lichtenthaler e Wellburn (1983), pelas seguintes equações:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 12.21A_{663} - 2.81A_{646} \quad [9]$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 20.13A_{646} - 5.03A_{663} \quad [10]$$

$$\text{clorofila total} = \text{Chl } a + \text{Chl } b \quad [11].$$

2.8.3 Avaliação do crescimento e do conteúdo em clorofilas da *Lemna gibba*

Os efeitos dos fulerenos no crescimento vegetativo de *Lemna gibba* foram avaliados considerando as alterações na taxa específica de crescimento e na quantidade de clorofilas por unidade de massa fresca de plantas. As plantas foram cultivadas em meio hidropónico de acordo com as especificações da norma OECD (2002) com algumas modificações. As plantas, 10 colónias com 3 frondes por colónia, foram selecionadas de culturas mantidas em contínuo no laboratório e transferidas para cristalizadores de vidro contendo 15 ml de solução de *Hutner's* (Brain e Solomon, 2007). Os fulerenos foram adicionados a partir das suas suspensões aquosas concentradas de forma a obter a gama de concentrações indicadas nas figuras, isto é entre 0 e 10 mg/L para o C₆₀ e entre 0 e 100 mg/L para o C₆₀(OH)₁₈₋₂₂. As plantas foram incubadas numa câmara com controlo de temperatura, luminosidade e humidade (Convion mod. E7/2), à temperatura de 20 ± 2 °C sob 50 μmol/m²/s de radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*, na designação anglo-saxónica *Photosynthetic Active Radiation*), emitida por duas lâmpadas fluorescentes

(Osram Sylvania), com um ciclo de iluminação de 16 h (Juhel et al., 2011), durante 7 dias. A avaliação dos efeitos dos fulerenos na reprodução vegetativa de *Lemna gibba* foi realizada aos 3, 5 e 7 dias de exposição por meio da contagem do número de “fronds” formados.

A taxa relativa de crescimento (RGR) foi calculada de acordo com a seguinte equação (Kufel et al., 2012):

$$\text{RGR} = \frac{\ln x_1 - \ln x_2}{t_1 - t_2} \quad [12]$$

onde x_1 e x_2 corresponde ao número de “fronds” no tempo t_1 (0 dias) e t_2 (7 dias), respetivamente.

Após os 7 dias de exposição, as plantas, utilizadas em cada ensaio, foram recolhidas e a sua massa (também designado como peso fresco) foi determinada numa balança analítica. As clorofilas foram extraídas com uma solução de acetona/água (80:20, v/v) e quantificadas como previamente descrito. O conteúdo de clorofilas foi expresso em quantidade (μg) de clorofila *a* (Chl *a*), de clorofila *b* (Chl *b*) ou de clorofila total (Chl *a* + Chl *b*) por unidade de massa (mg) de plantas.

2.8.4 Avaliação da atividade fotossintética da *Lemna gibba*

O efeito dos fulerenos na eficiência fotossintética de cloroplastos isolados da *Lemna gibba* foi avaliado polarograficamente pela medição da taxa de síntese de oxigénio com um eléctrodo de oxigénio tipo Clark (Hansatech Norfolk UK) associado a um computador, como previamente descrito por Babu e colaboradores (2001), com algumas modificações.

Os ensaios foram realizados numa câmara de reação opaca e fechada, termostaticada a 20 °C, sob agitação magnética contínua, em 2 ml de meio de reação (sorbitol 345 mM, MgCl_2 2 mM, tricine-NaOH 2 mM, pH 8.4) suplementado com 1 μM de azida de sódio, 1,25 μM de metil viologénio (MV^{2+}) e com suspensão de cloroplastos (correspondente a 75 μg de clorofila total) na ausência (controlo) ou na presença de concentrações crescentes de fulerenos.

Após 5 minutos de incubação no escuro, a reação foi iniciada ligando a fonte de luz (1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de radiação fotossinteticamente ativa) e as variações de oxigénio na câmara de reação registadas continuamente. Após 2 minutos, a fonte de luz foi desligada para confirmar que a variação de oxigénio era dependente da luz e um minuto depois novamente ligada. O ensaio terminou com a adição de 10 μl de uma solução de 10 mM em DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil-ureia), herbicida que bloqueia o transporte de eletrões entre a plastoquinona e o citocromo b, para garantir que a produção de oxigénio resultava exclusivamente da atividade fotossintética dos cloroplastos (Calvayrac et al., 1979).

É importante salientar que a utilização de metil viologénio (MV^{2+}), como aceitador final dos eletrões provenientes da cadeia transportadora de eletrões do sistema fotossintético, promove um conjunto de reações que permite avaliar a taxa de produção de oxigénio pelos cloroplastos pela redução da concentração de oxigénio na câmara de reação, tal como descrito pelo seguinte sistema reacional:

- a) No fotossistema II, a água é decomposta na presença de luz (reação de Hill)



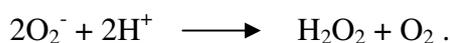
- b) O metil viologénio (MV^{2+}) é reduzido pelos eletrões provenientes da cadeia transportadora de eletrões do sistema fotossintético



- c) O metil viologénio reduzido (MV^+) reage com o oxigénio molecular (auto-oxidação) com produção de superóxido:



- d) O superóxido sofre dismutação:



A conjugação das 4 reações acima descritas origina a conhecida reação Mehler (Makino et al., 2002):



Assim, o conjunto das reações mostra o consumo de $\frac{1}{2} \text{O}_2$ por cada 2 eletrões que são transferidos ao longo do sistema fotossintético e a taxa de consumo de O_2 na câmara de reação está em estequiometria com a sua produção pelo fotossistema II dos cloroplastos.

A taxa de produção de oxigénio pelos cloroplastos, expressa em $\mu\text{mol O}_2/\text{mg}$ de Clorofila total/h, foi determinada após análise dos dados com o *software* fornecido com o equipamento (Oxylab ver 1.15 Hansatech, Norfolk UK).

2.9 Avaliação da toxicidade dos fulerenos em células animais

2.9.1 Culturas primárias de astrócitos

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de ratos C57/BL6 com 3 dias de idade, de acordo com o método descrito por Banker e Goslin (1999). Os ratos foram colocados em gelo e ao manifestarem sinais de hipotermia foram imediatamente retirados e decapitados. Os cérebros foram removidos e colocados numa caixa de petri contendo solução de HBSS - *Hank's Buffered Salt Solution* (NaCl 136,7 mM, NaHCO₃ 2,1 mM, KH₂PO₄ 0,22 μM, KCl 5,3 mM, glucose 2,7 mM, Hepes 10 mM, pH 7,3), a cerca de 4 °C. O cerebelo, o hipocampo e o tálamo foram removidos e desprezados e o restante tecido (córtex) foi triturado. Todo este procedimento foi realizado sobre gelo granulado, para manter a temperatura entre os 0 e os 4 °C. O tecido de córtex triturado foi colocado em HBSS suplementado com 0,25% de tripsina, 0,001% de DNase I e 10 μg/ml de gentamicina à temperatura de 37 °C, durante 20 minutos para a degradação do tecido. Após os 20 minutos de incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 100 g durante 1 minuto, numa centrífuga (Rotofix32A) refrigerada. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense num volume de HBSS suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) para inibir a ação da tripsina e centrifugado a 100 g durante 1 minuto. O sobrenadante foi novamente removido e o sedimento ressuspense em HBSS e centrifugado a 350 g durante 4 minutos, à temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspense em meio *Dulbecco's Modified Eagles' Medium* (DMEM) a 13,4 g/L, com NaHCO₃ 10 mM, Hepes 25 mM, gentamicina 0,26 mM (pH 7,3) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² com uma densidade celular de 3x10⁶ por frasco e mantidas a 37 °C numa incubadora (NuAire) com 5% de dióxido de carbono e o meio de cultura substituído de 2 em 2 dias. Quando as culturas (mistura de células da glia) atingiram uma confluência de 80%, as células da microglia e os oligodendrócitos, que cresceram sobre os astrócitos, foram retirados colocando os frascos no agitador orbital (GFL 3033) a 200 g durante 4 horas. Os astrócitos foram removidos do fundo do frasco pela adição de tripsina a 0,05% em HBSS, após lavagem dos frascos com EDTA 1 mM em HBSS, e semeadas (em DMEM) em microplacas de 12 poços a uma densidade celular de 4x10⁴ células por poço para a realização dos ensaios de citotoxicidade com os fulerenos.

2.9.2 Cultura de linhas celulares

As células HeLa, uma linha celular tumoral epitelial humana proveniente do carcinoma do colo do útero (cérnix) (ATCC® CCL-2™), as células neuro2a, uma linha celular proveniente de neuroblastoma de rato (ATCC® CCL-131™) e as células U87 provenientes de glioblastoma humano (ATCC® HTB14), foram cultivadas em frascos de 75 cm² contendo meio DMEM (13,4 g/L) com NaHCO₃ 12 mM, Hepes 10 mM, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 unidades/ml (pH 7,3) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) e foram mantidas a 37 °C numa incubadora (NuAire) com 5% de dióxido de carbono. As células HT-1080, provenientes de fibrossarcoma humano (ATCC® CCL-121™) foram cultivadas em meio DMEM (8,3 g/L) com NaHCO₃ 44 mM, piruvato de sódio 1 mM, L-glutamina 4 mM, glucose 5,5 mM, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 unidades/ml (pH 7,3) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®). Quando as culturas de células atingiram uma confluência de 80% os frascos foram lavados com tampão PBS (NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, KCl 0,2 g/L, pH 7,3) e as células aderentes ao fundo dos frascos foram retiradas pela adição de tripsina a 0,25% em meio de dissociação (NaCl 8 g/L, Na₂HPO₄ 1,16 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, KCl 0,2 g/L, EDTA 0,16 g/L, vermelho de fenol 400 µl/L, pH 7,3). As células HeLa e neuro2a foram semeadas (em DMEM) em microplacas de 48 poços a uma densidade celular de 4x10⁴ células por poço para a realização dos ensaios de citotoxicidade com os fulerenos, e no caso das células neuro2a, para os ensaios de avaliação do efeito protetor dos fulerenos no stresse oxidativo induzido por *t*-butil-hidroperóxido. Para os ensaios de transfecção, as células HT-1080, U87 e HeLa foram semeadas em microplacas de 12 poços a uma densidade celular de 1 x 10⁵ células por poço no caso das células HT-1080 e HeLa e de 7 x 10⁴ células por poço, no caso das células U87.

2.9.3 Exposição das células aos fulerenos e determinação da viabilidade celular

As células (astrócitos, células HeLa e neuro2a) semeadas nas respectivas placas, conforme indicado atrás, foram incubadas, a 37 °C, numa atmosfera com 5% de dióxido de carbono, durante 24 horas para promover a sua adesão ao fundo das placas. Após este período de tempo, o meio de cultura das células foi removido e substituído por novo meio

de cultura suplementado com concentrações crescentes de fulerenos nas gamas de 0 a 15 mg/L para C₆₀ e de 0 a 100 mg/L para C₆₀(OH)₁₈₋₂₂. Cada concentração de fulereno foi testada numa série de três poços. As células foram incubadas com os fulerenos durante 24 ou 48 horas nas condições descritas acima. Ao fim de cada um destes períodos de tempo, o meio das células foi removido para retirar os fulerenos não absorvidos e substituído por meio de cultura novo suplementado com 0,01 mg/ml de resazurina, após o que as células foram incubadas por mais um período de 2 horas. A redução da resazurina a resorufina, dependente do potencial redox da célula, foi utilizada como uma medida da viabilidade celular (Abe et al., 2002). Assim, o efeito dos fulerenos sobre a viabilidade celular foi avaliado medindo a absorvência, em cada poço, a 570 e a 600 nm, num leitor de microplacas SPECTRAmax PLUS 384 (Molecular devices, Union City, CA). Os resultados, expressos em percentagem do controlo, foram calculados pela seguinte equação:

$$\text{viabilidade celular (\% controlo)} = \frac{(\text{Abs}_{570 \text{ nm}} - \text{Abs}_{600 \text{ nm}})_{\text{células tratadas}}}{(\text{Abs}_{570 \text{ nm}} - \text{Abs}_{600 \text{ nm}})_{\text{células controlo}}} \times 100 \quad [13].$$

2.10 Avaliação do efeito protetor dos fulerenos no stresse oxidativo induzido por *t*-butil-hidroperóxido em células em cultura

As células neuro2a, semeadas nas condições previamente mencionadas e após um período de 24 horas de incubação (para garantir a adesão das células ao fundo dos poços), foram submetidas à substituição do meio de cultura por um meio de cultura novo suplementado com alíquotas de uma solução de *t*-butil-hidroperóxido (indutor de stresse oxidativo) de modo a obter a gama de concentrações de 0 a 75 μM. Cada concentração de *t*-butil-hidroperóxido foi testada numa série de três poços. As células foram incubadas com *t*-butil-hidroperóxido durante 24 horas, nas condições acima descritas, de forma a determinar a concentração de *t*-butil-hidroperóxido que reduzia em 50% a massa celular. O conteúdo proteico das células foi determinado pelo método da sulforodamina B (Vichai e Kirtikara, 2006). Para esse efeito, o meio de cultura das células foi removido e as células lavadas com PBS. As células foram fixadas com uma solução de metanol 1% em ácido acético à temperatura de 4 °C durante 1 hora. O metanol foi depois removido e as placas

secas à temperatura ambiente. As células foram incubadas com uma solução de sulforodamina B 0,5% (em ácido acético 1%) durante 1 hora à temperatura de 37 °C. A sulforodamina B foi depois removida e as células lavadas várias vezes com uma solução de ácido acético 1% de forma a eliminar o excesso de sulforodamina B (não ligada às proteínas). As placas foram secas à temperatura ambiente e a sulforodamina B ligada às proteínas das células foi extraída com a adição de uma solução de Tris 10 mM (pH 10). Alíquotas das soluções de sulforodaminada B, retiradas de cada um dos poços, foram transferidas para uma microplaca de 96 poços e a absorvência a 540 nm foi medida num leitor de microplacas Victor X (Perkin Elmer). Determinada a concentração de *t*-butil-hidroperóxido que reduzia em 50% a massa celular, foram realizados os ensaios de avaliação do efeito protetor dos fulerenos no stresse oxidativo induzido pelo *t*-butil-hidroperóxido às células neuro2a. Deste modo, as células foram semeadas em placas de 48 poços a uma densidade celular de 4×10^4 células por poço e colocadas a 37 °C numa incubadora (NuAire) com 5% de dióxido de carbono durante 24 horas para promover a adesão das células. A seguir, o meio de cultura das células foi removido e substituído por novo meio de cultura suplementado com concentrações crescentes de fulerenos nas gamas de 0 a 15 mg/L para C₆₀ e de 0 a 100 mg/L para C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ e com o volume de *t*-butil-hidroperóxido correspondente à concentração que reduzia a massa celular em 50%. Cada concentração de fulereno foi testada numa série de três poços. As células foram incubadas com os fulerenos e com o *t*-butil-hidroperóxido durante 24 horas nas condições acima descritas. Ao fim deste período de incubação o conteúdo proteico das células foi determinado pelo método da sulforodamina B, anteriormente descrito. Paralelamente, foi realizado um outro ensaio em que as células foram incubadas durante duas horas com concentrações crescentes de fulerenos em DMEM nas gamas de 0 a 15 mg/L para C₆₀ e de 0 a 100 mg/L para C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ numa série de três poços. O meio de cultura das células foi depois removido e substituído por novo meio de cultura suplementado com o volume de *t*-butil-hidroperóxido correspondente à concentração que reduziu a massa celular em 50%. As células foram incubadas com *t*-butil-hidroperóxido durante 24 horas nas condições acima descritas. A seguir, foi determinado o conteúdo proteico das células pelo método da sulforodamina B, anteriormente descrito. Em ambos os ensaios foi ainda utilizado como controlo positivo o antioxidante trolox (100 µM). De forma a eliminar possíveis interferências das nanopartículas com o método de determinação do conteúdo proteico das células foram realizados os mesmos ensaios com os fulerenos na ausência de células.

2.11 Avaliação da expressão e do silenciamento da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) em células em cultura

2.11.1 Lipossomas e preparação dos complexos

Lipossomas constituídos por DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano) e DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), na razão molar de 1:2 e 1:6, foram preparados de acordo com o método descrito por Campbell e colaboradores (1995) com algumas modificações. Assim, foram retirados os volumes necessários de soluções de DOTAP e DOPE em clorofórmio para obter uma mistura de lípidos com a razão molar DOTAP:DOPE de 1:2 ou 1:6. Às misturas de lípidos contidos em balões de fundo redondo foi adicionada uma solução de C₆₀ em tolueno nos volumes necessários para obter razões molares de C₆₀:lípidos na gama de 1:5 a 1:20 (para a preparação dos vetores de siRNA) e de 1:10 a 1:100 (para a preparação de vetores de DNA). Um controlo, constituído pela mistura DOTAP:DOPE na razão molar de 1:2 sem adição de C₆₀, foi preparado contendo o volume máximo de tolueno existente nas preparações em que C₆₀ foi adicionado. Os solventes das misturas lipídicas com ou sem C₆₀ (clorofórmio e tolueno) foram evaporados, sob vácuo, num evaporador rotatório, de forma a obter uma película fina e homogénea de lípidos na parede do balão. Estas preparações permaneceram sob vácuo, no evaporador rotatório, durante 10 minutos de forma a garantir a máxima remoção de resíduos de clorofórmio e de tolueno. Os lípidos com ou sem C₆₀ foram dissolvidos em 100 µl de etanol ultrapuro e as misturas resultantes foram injetadas com uma seringa Hamilton de 250 µl em 500 µl de uma solução tampão de HBS (NaCl 140 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) pré-aquecida a 40 °C e sob vortex. As vesículas multilamelares (MLV) resultantes foram submetidas a ultra-sons para obter vesículas unilamelares pequenas (SUV) e as preparações lipídicas finais foram guardadas a 4 °C.

Os complexos para silenciamento de GFP foram preparados em meio OptiMEM adicionando 25 pmol de siRNA (que silencia a GFP) às preparações de SUVs contendo ou não C₆₀, de forma a obter as razões de carga (+/-) pretendidas (de 1/1,5 a 6/1). Paralelamente, foram preparados complexos contendo siRNA que não silencia a GFP (siRNAmut). Os complexos para indução da expressão de GFP foram também preparados em meio OptiMEM adicionando 0,5 µg de plasmídeo que contém o gene que codifica a

GFP às preparações de SUVs contendo ou não C₆₀, de forma a obter as razões de carga (+/-) pretendidas (de 1/1 a 2/1).

Os complexos (com siRNA ou com plasmídeo de DNA) foram incubados durante 15 a 30 minutos à temperatura ambiente e utilizados de imediato nos ensaios de transfecção. Como controlo positivo foram preparados complexos de siRNA ou plasmídeo de DNA com o reagente comercial LipofectaminaTM 2000.

2.11.2 Avaliação da atividade de transfecção

As células HT-1080, U87 e HeLa semeadas nas condições previamente descritas e incubadas durante 24 horas (para garantir a adesão das células ao fundo dos poços), foram lavadas com PBS e incubadas com os complexos, num volume final de 500 µl de OptiMEM por poço, durante 4 horas (a 37 °C e em atmosfera com 5% de dióxido de carbono). Ao fim do período de incubação de 4 horas, o meio de cultura com os complexos foi removido e as células foram lavadas com PBS, tendo sido adicionado meio de cultura novo. As células foram incubadas nas mesmas condições por mais 44 horas, de forma a proporcionar o silenciamento de GFP (células HT-1080 e U87) e a expressão de GFP (células HeLa) pelos complexos com siRNA e plasmídeo de DNA, respetivamente. Findo este tempo de incubação, foi avaliada a viabilidade celular pelo método modificado do Alamar blue anteriormente descrito e determinada a eficiência da transfecção por citometria de fluxo.

2.11.3 Avaliação da expressão e do silenciamento de GFP pelos complexos por citometria de fluxo

A determinação da expressão da proteína GFP nas células HeLa e do seu silenciamento nas células HT-1080 e U87 pelos complexos foi realizada por citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson). Decorridas 48 horas de transfecção, as células HeLa, HT-1080 e U87 foram lavadas com PBS e, no caso das células HeLa e HT-1080, foram destacadas das microplacas com tripsina (0,25% em meio de dissociação) durante 10

minutos a 37 °C. Foi adicionado DMEM para inibir a ação da tripsina e as células foram transferidas para tubos adequados e foram centrifugadas a 200 g numa centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810 R), durante 5 minutos, a 4 °C. O sedimento obtido foi ressuspenso em PBS, tendo-se procedido a uma nova centrifugação para remover vestígios do meio de cultura. O sedimento desta segunda centrifugação foi ressuspenso em PBS e imediatamente analisado por citometria de fluxo. As células transfectadas foram detetadas e contadas por meio de um citómetro de fluxo FACSCalibur da Becton Dickinson (Becton Dickinson, San Jose, CA). Selecionou-se um comprimento de onda de excitação de 488 nm e a emissão de fluorescência foi detetada a 530 nm. A percentagem do número total de células que expressam GFP ou em que GFP foi silenciada foi determinada por software do aparelho. Os valores obtidos foram por sua vez expressos em percentagem do controlo (células não transfectadas). Para cada amostra foram registados 10000 eventos.

2.12 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos neste trabalho foi efetuada através do programa informático “Kaleida Graph” (versão 4.0). Os valores experimentais foram expressos como a média \pm desvio padrão (STD) obtida com o número de experiências indicadas nas figuras. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas por uma análise de variância utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Interação de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ com as biomembranas: da partilha aos efeitos na bioenergética mitocondrial

O fulereno C₆₀, constituído exclusivamente por carbono, é uma molécula hidrofóbica com baixa solubilidade em água e consequentemente um elevado carácter lipofílico. A sua modificação química pela adição de grupos hidroxilo à superfície produz moléculas, como por exemplo o C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, menos hidrofóbicas e mais solúveis em água alargando o espetro de aplicações biológicas dos fulerenos (Bosi et al., 2003). No entanto, é também previsível que a alteração das características físico-químicas dos fulerenos, por modificação da química da superfície de C₆₀, modele a atividade biológica desta família de compostos. Inúmeros dados experimentais obtidos com séries de moléculas quimicamente relacionadas suportam esta ideia, mostrando que alterações químicas que modificam a solubilidade em água e a lipofilicidade das moléculas condicionam de modo significativo tanto a sua atividade farmacológica como a sua atividade toxicológica.

Num contexto farmacológico, as moléculas são desenhadas e selecionadas de forma a que as suas propriedades físico-químicas lhes permitam alcançar alvos celulares específicos no organismo e despoletem respostas biológicas adequadas. Apesar de cada alvo celular exigir moléculas com estrutura e propriedades específicas, a lipofilicidade e a solubilidade em água são atributos transversalmente considerados como fundamentais para uma diversidade de compostos, com diferentes aplicações terapêuticas. A lipofilicidade determina a partilha e a capacidade do fármaco permear as biomembranas e atingir os alvos intracelulares a que se destina, enquanto a solubilidade em água define a proporção de composto solubilizado nos fluídos biológicos e transportado pela corrente sanguínea (Jurado et al., 2012). Assim, independentemente da via de administração, as interações dos fármacos com as membranas das células desempenham um papel importante na biodisponibilidade do fármaco, regulando a eficácia da sua absorção, a distribuição através dos diferentes órgãos, a acumulação no órgão/tecido alvo e a sua excreção do organismo. Num contexto toxicológico, a relevância destas propriedades é bem ilustrado por um estudo sistemático efetuado durante mais de duas décadas no nosso laboratório, com vários inseticidas organofosforados (Antunes-Madeira et al., 1994; Videira et al., 1996) e organoclorados (Antunes-Madeira et al., 1991; Moreno e Madeira, 1991; Videira et al., 2002). Este estudo mostrou que peculiaridades ao nível da estrutura e configuração molecular daqueles inseticidas, com reflexo na sua polaridade/hidrofobicidade, conduzem

a localizações preferenciais através da espessura da membrana e a coeficientes de partilha entre as fases membranar e aquosa significativamente diferentes. Por outro lado, as diferenças detetadas ao nível da localização e da partilha dos inseticidas permitiram explicar vários aspetos relativos aos mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento toxicológico exibido pelos diferentes compostos (Antunes-Madeira e Madeira, 1985, 1986, 1987; Antunes-Madeira et al., 1994; Videira et al., 1996).

Deste modo, a hipótese que esteve na base do presente trabalho sustenta que uma abordagem mecanística dos efeitos biológicos dos nanomateriais (nomeadamente dos fulerenos) deve ter em consideração os seus locais de acumulação nas biomembranas e as alterações que provocam nas suas propriedades. Este pressuposto assenta no conhecimento das características bioquímicas e biofísicas das membranas celulares, cuja função primária, mas de forma nenhuma a única, é a compartimentalização, estabelecendo uma fronteira entre o interior e o exterior da célula e também, no caso das células eucarióticas, fronteiras intracelulares entre compartimentos que desempenham funções distintas dentro da célula. As biomembranas são estruturas dinâmicas com cerca de 5 nm de espessura, que emergem da auto-organização de centenas de diferentes moléculas de lípido em duas monocamadas lipídicas justapostas (bicamada) com uma capacidade inerente para incluir e discriminar proteínas específicas (Gennis, 1989). O gradiente de fluidez através da sua espessura, a assimetria estrutural entre as duas monocamadas e a heterogeneidade lateral (*e.g.* “rafts” ou jangadas lipídicas) são atributos exibidos pela matriz lipídica das biomembranas que desempenham um papel crucial na regulação da atividade celular (van Meer et al., 2008). A conceptualização das biomembranas como barreira seletiva de permeabilidade (*i.e.* com a capacidade de manter e regular gradientes de concentração de iões e moléculas entre compartimentos) desenvolvida por Pfeffer ainda no século XIX (Pfeffer, 1877) é apenas um dos múltiplos aspetos funcionais que emergem da organização dinâmica das membranas. Atualmente, sabe-se que os lípidos membranares, diretamente ou através dos seus metabolitos, desempenham um papel ativo em múltiplas vias de transdução de sinal, assegurando processos de comunicação intracelular e intercelular (Eyster, 2007). Adicionalmente, a matriz lipídica acolhe e regula um grande número de atividades metabólicas e biossintéticas, como por exemplo a fosforilação oxidativa que ocorre na membrana interna das mitocôndrias e é responsável pela síntese de mais de 90% do ATP utilizado pelas células eucarióticas (Gennis, 1989).

Neste contexto, é previsível que a interação dos fulerenos com as membranas biológicas provoque perturbações funcionais, dependentes da concentração e do local de

acumulação das nanopartículas na bicamada lipídica. Assim, no presente capítulo, apresentamos um estudo da interação das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ com as membranas, tendo em vista investigar três aspectos essenciais para compreender o potencial tanto toxicológico como farmacológico dos fulerenos, designadamente: a) a relação entre as características físico-químicas dos fulerenos e a sua localização preferencial através da espessura da bicamada lipídica; b) a relação entre as características físico-químicas dos fulerenos e a extensão da partilha em membranas lipídicas artificiais e nativas (membranas isoladas de mitocôndrias de fígado de rato) e, c) o impacto da localização e da extensão de acumulação membranar de cada fullereno na atividade funcional da membrana interna da mitocôndria, isto é, na bioenergética mitocondrial.

3.1.1 Caracterização das formulações aquosas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$

A funcionalização de C_{60} pela ligação de grupos hidroxilo, apesar de preservar muitas das propriedades óticas e eletrónicas inerentes à molécula de C_{60} (Bracher e Schuster, 2002) promove alterações na química superficial da molécula, afetando significativamente o seu comportamento em sistemas aquosos com previsíveis reflexos na interação com os sistemas biológicos. Adicionalmente, os fulerenos quando dispersos em água formam sistemas coloidais que, como todos os sistemas coloidais, são do ponto de vista termodinâmico instáveis, apresentando uma elevada sensibilidade a alterações das propriedades físico-químicas do seu meio envolvente (*e.g.* força iónica). Assim, meios aquosos com diferentes composições químicas podem afetar a cinética de agregação dos fulerenos e, conseqüentemente, alterar o tamanho e a carga superficial das partículas suspensas. Portanto, o estudo da atividade biológica dos fulerenos requer a caracterização do tamanho, da carga superficial e da estabilidade temporal das nanopartículas em todas as formulações aquosas produzidas e nas diferentes soluções tampão usadas para simular os meios fisiológicos.

As dimensões das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ nas suspensões aquosas de armazenamento e após a sua diluição nas soluções tampão usadas nos estudos de partilha e bioenergética mitocondrial, foram avaliadas por espectroscopia de correlação de fotões, através da medição da dispersão dinâmica de luz (DLS, na designação anglo-saxónica *Dynamic Light Scattering*.) resultante dos movimentos Brownianos das

nanopartículas em suspensão (Fig. 8). Pela análise dos resultados obtidos, é possível concluir que as suspensões aquosas de C_{60} são constituídas maioritariamente por nanopartículas com um diâmetro médio de $34,5 \pm 4,5$ nm, o que indica a presença de aglomerados hidratados formados por várias moléculas de C_{60} . As suspensões aquosas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ apresentam, por sua vez, nanopartículas com dimensões inferiores a 3,9 nm (diâmetro médio de $2,5 \pm 0,3$ nm), sugerindo a predominância de moléculas individuais de fulereno no estado hidratado. A diluição das suspensões aquosas de ambos os fulerenos nas soluções tampão usadas para determinar a partilha e os efeitos na bioenergética mitocondrial não promoveram alterações no diâmetro médio exibido pelas nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ em água, como mostram os resultados da tabela inserida na figura 8.

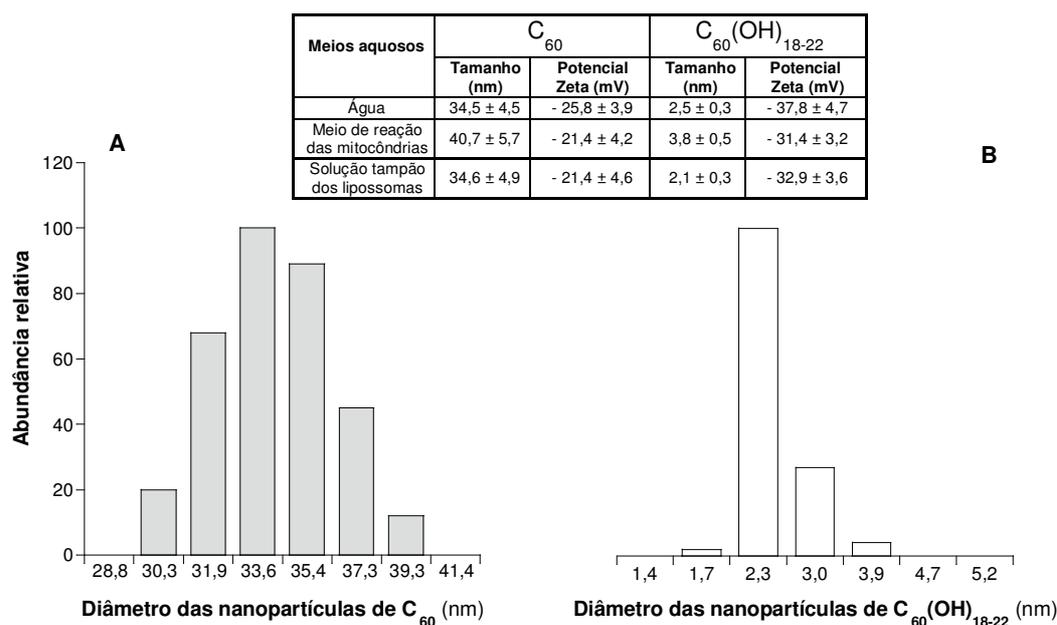


Figura 8 – Registos típicos da distribuição do tamanho das nanopartículas de C_{60} (A) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (B) em suspensões em água. Os registos foram obtidos a 25 °C, pela dispersão dinâmica de luz, usando um laser de Hélio/Néon a 658 nm como fonte de emissão e o detetor orientado perpendicularmente à direção de emissão da luz. Na tabela inserida na figura estão representados os valores médios (\pm desvio padrão) do diâmetro e do potencial Zeta das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ em água e nas soluções tampão usadas para determinar a partilha e os efeitos na bioenergética mitocondrial.

Os valores de potencial Zeta, obtidos pela mobilidade eletroforética das nanopartículas nas suspensões aquosas (tabela inserida na figura 8), indicam que as nanopartículas hidratadas de ambos os fulerenos adquirem carga superficial negativa ($-25,8 \pm 3,9$ mV e $-37,8 \pm 4,7$ mV para C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ em água, respetivamente). Os valores negativos de potencial Zeta exibidos pelas nanopartículas de C_{60} em suspensão aquosa sugerem que cada agregado molecular está rodeado por uma rede de moléculas de água com orientações definidas por pontes de hidrogénio, formando uma camada hidrófila estável que confere uma carga superficial negativa ao aglomerado. As repulsões eletrostáticas entre aglomerados vizinhos, resultante da sua carga superficial negativa, devem impedir a formação de grandes aglomerados, conferindo estabilidade temporal às suspensões aquosas do fulereno. Os valores mais negativos de potencial Zeta exibidos pelas nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ sugerem que a hidratação deve ser favorecida pela presença de grupos OH à superfície da molécula de fulereno, capazes de estabelecer ligações de hidrogénio com as moléculas de água fixando a sua orientação e impedindo a formação de aglomerados moleculares de fulereno de grandes dimensões. Do mesmo modo que o tamanho, também o potencial Zeta exibido pelas nanopartículas de ambos os fulerenos em suspensão aquosa foi preservado após a sua diluição nas soluções tampão usadas para determinar a partilha e os efeitos na bioenergética mitocondrial (tabela inserida na figura 8).

3.1.2 Localização e partilha das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ em membranas biológicas

Como foi descrito atrás, as nanopartículas de C_{60} distinguem-se das de $C_{60}(OH)_{18-22}$ nas várias formulações aquosas utilizadas, pelo seu tamanho e pela carga superficial e química de superfície. Desta forma, o objetivo seguinte deste trabalho consistiu em estudar o modo como aquelas propriedades influenciam a interação dos fulerenos com as membranas biológicas. Assim, os coeficientes de partilha das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ entre água e membranas, bem como a sua localização preferencial ao longo da espessura de bicamada lipídica, foram investigadas com recurso a duas sondas membranares, o ácido 16-(9-antioiloxi)-palmítico (16-AP) e o ácido 2-(9-antioiloxi)-

esteárico (2-AS). Estas sondas ficam ancoradas à superfície polar da membrana pelo grupo carboxílico que, a pH 7, apresenta carga negativa. Assim, cada sonda apresenta o fluoróforo (antraceno) a uma profundidade distinta na membrana: no interior hidrofóbico, no caso da sonda 16-AP e próximo das regiões polares da bicamada lipídica, no caso da sonda 2-AS (Cadenhead et al., 1977; Videira et al., 1999). A figura 9 mostra o efeito de concentrações crescentes de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ nos espectros de emissão de fluorescência das sondas 16-AP e 2-AS incorporadas em lipossomas unilamelares de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) com 200 nm de diâmetro, à temperatura de 50 °C.

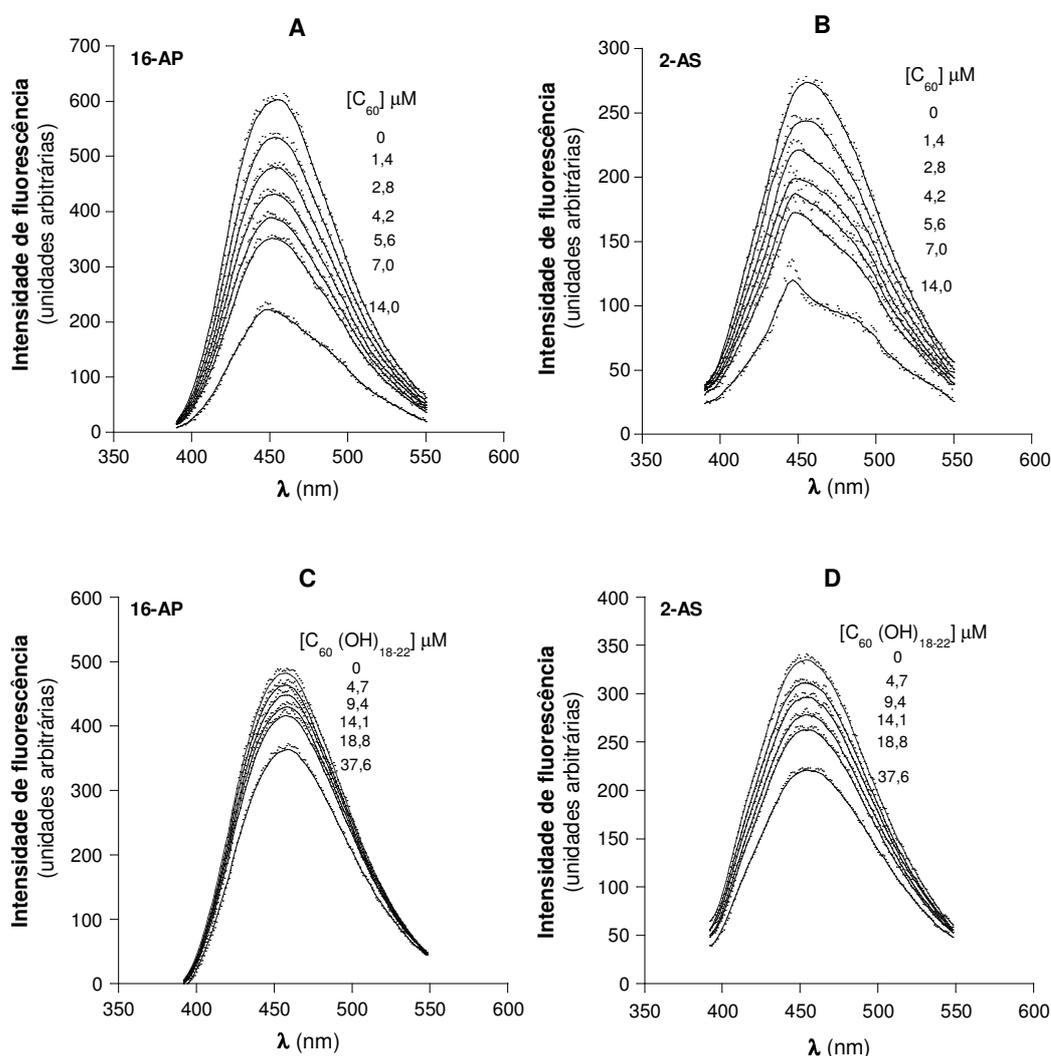


Figura 9 – Espectros de emissão das sondas fluorescentes 2-AS e 16-AP incorporadas em membranas de DPPC na fase fluida (à temperatura de $50 \pm 0,1$ °C), na ausência e na presença de concentrações crescentes de nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$. O espectro de emissão da sonda, no intervalo de 390-550 nm, foi obtido com a excitação a 365 nm. As bandas de excitação e emissão foram ambas de 5 nm e a velocidade de aquisição de dados foi de 60 nm/min, com resolução de 0,1.

O aumento da concentração de nanopartículas de C_{60} até $14 \mu\text{M}$ promoveu o decréscimo progressivo da intensidade de fluorescência das sondas 16-AP (Fig. 9A) e 2-AS (Fig. 9B) sem alterar as suas características espectrais. Para ambas as sondas, a supressão de fluorescência, dada pela razão entre a intensidade máxima de fluorescência na ausência (F_0) e na presença (F) do fulereno (F_0/F), variou de forma diretamente proporcional com a concentração molar do fulereno, dando lugar a uma função linear com interceto na origem de 1 e declive positivo (Fig. 10A), descrita pela equação de Stern-Volmer. É notório que a eficiência de supressão de fluorescência (proporcional à constante aparente de Stern-Volmer, correspondente ao declive da reta) foi significativamente maior para a sonda 16-AP do que para a sonda 2-AS (Fig. 10A), sugerindo uma incorporação preferencial das moléculas de C_{60} no interior hidrofóbico das membranas de DPPC, monitorizado pela sonda 16-AP.

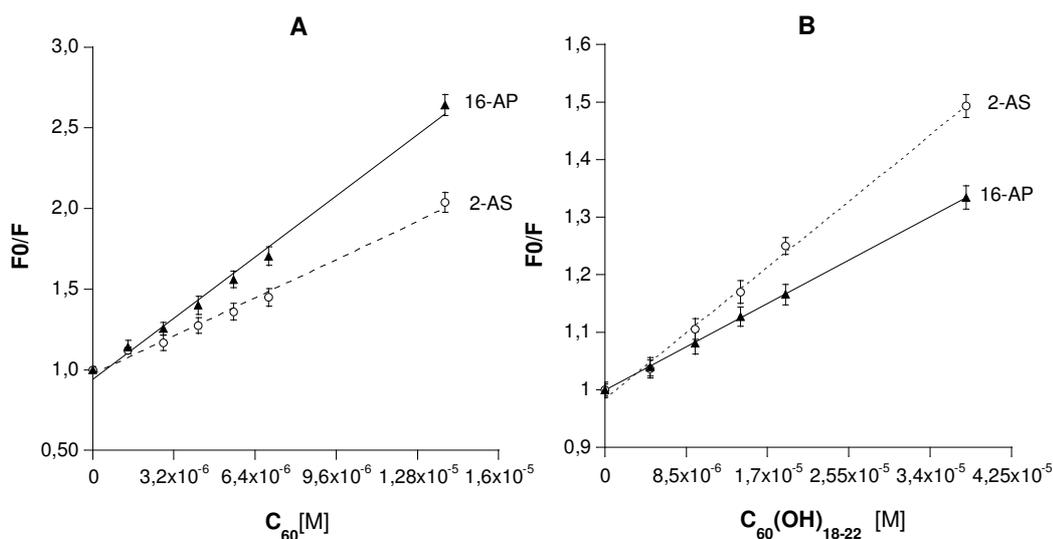


Figura 10 –Variação da supressão de fluorescência das sondas 16-AP e 2-AS incorporadas em membranas de DPPC ($200 \mu\text{M}$) na fase fluida (à temperatura de $50 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$), em função da concentração das nanopartículas de C_{60} (A) e de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ (B). O declive das retas permitiu determinar a constante aparente de Stern-Volmer.

À semelhança de C_{60} , concentrações crescentes das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ induziram um decréscimo linear da razão F0/F para ambas as sondas (Fig. 10B). No entanto, estas nanopartículas foram mais eficazes a suprimir a fluorescência da sonda 2-AS do que a fluorescência da sonda 16-AP. De facto, as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ exerceram efeitos limitados sobre a intensidade de fluorescência da sonda 16-AP (Fig. 9C), mas diminuíram significativamente a intensidade de fluorescência da sonda 2-AS (Fig. 9D), não tendo alterado as características espectrais de nenhuma das sondas. Este comportamento sugere uma localização preferencial das nanopartículas deste fullereno, em regiões membranares próximas da porção polar dos lípidos, monitorizada por 2-AS.

Em suma, os estudos com membranas de DPPC em fase fluída e com as duas sondas fluorescentes mostraram que ambos os fullerenos têm capacidade de interagir com os lípidos membranares, acumulando-se, porém, em locais distintos da espessura da membrana: as nanopartículas de C_{60} incorporam-se essencialmente no centro hidrofóbico da membrana, enquanto as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ preferem regiões próximas da interface lípido-água (Fig. 11). Por esta razão, seleccionámos a sonda 16-AP para determinar o coeficiente de partilha das nanopartículas de C_{60} entre as fases membranar e aquosa e a sonda 2-AS para determinar o coeficiente de partilha das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$.

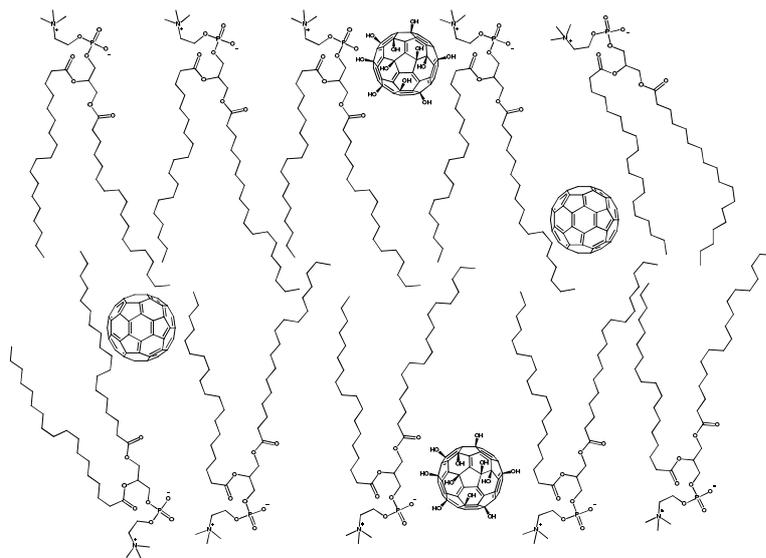


Figura 11 – Localização dos fullerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ numa bicamada lipídica. O C_{60} localiza-se preferencialmente no interior hidrofóbico da membrana e o $C_{60}(OH)_{18-22}$ na interface lípido-água.

A figura 12 mostra a supressão de fluorescência das sondas 16-AP (A) e 2-AS (C) incorporadas em membranas de DPPC em função do aumento da concentração de nanopartículas de C_{60} (A) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C). Para ambos os fulerenos, a constante aparente de Stern-Volmer (dada pelo declive da reta) diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de lípido de 100 para 600 μM . Adicionalmente, uma relação linear entre o inverso da constante aparente de Stern-Volmer ($1/K_{\text{ap}}$) e a fração de volume membranar de DPPC (α_m) foi obtida com as nanopartículas de C_{60} (Fig. 12B) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (Fig. 12D). De acordo com o previsto pela equação modificada de Stern-Volmer (ver equação 2 na secção 2.5.3 de material e métodos), o declive desta nova reta corresponde a $(1/K_q - 1/K_q K_p)$ e o interceto na origem toma o valor de $1/K_q K_p$, permitindo, desta forma, determinar o coeficiente de partilha (K_p) dos fulerenos entre a fase aquosa e a fase membranar. Os resultados obtidos, representados na Tabela I, mostram que o coeficiente de partilha entre a fase fluida de DPPC e a água é de 1247 para as nanopartículas de C_{60} e apenas 212 para as de $C_{60}(OH)_{18-22}$.

As bicamadas lipídicas preparadas a partir do lípido sintético puro DPPC fornecem um modelo simples para estudar a interação de uma diversidade de compostos com as membranas biológicas. No entanto, estas últimas, em comparação com as bicamadas de DPPC, são providas de um nível muito mais elevado de complexidade, principalmente em resultado das interações que se estabelecem entre as diferentes espécies lipídicas e entre os lípidos e as proteínas. Assim, utilizando a mesma estratégia descrita para as bicamadas de DPPC, os coeficientes de partilha das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ entre as fases membranar e aquosa foram igualmente determinados em membranas nativas, designadamente membranas de mitocôndrias de fígado de rato, dado a facilidade com que podem ser isoladas com um elevado grau de pureza. A figura 13 mostra as representações gráficas de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência das sondas 16-AP (A) e 2-AS (C) incorporadas em membranas mitocondriais em função do aumento da concentração de nanopartículas de C_{60} (A) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C). Tal como foi observado com as membranas de DPPC, a constante aparente de Stern-Volmer diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de lípido mitocondrial de 50 para 200 μM . Para ambos os fulerenos, a variação do inverso da constante aparente de Stern-Volmer ($1/K_{\text{ap}}$) em função da fração de volume membranar de lípido mitocondrial (α_m) é descrita por uma função linear (Fig 13B e D), permitindo determinar o coeficiente de partilha (K_p) dos fulerenos entre as membranas mitocondriais e a fase aquosa (Tabela I).

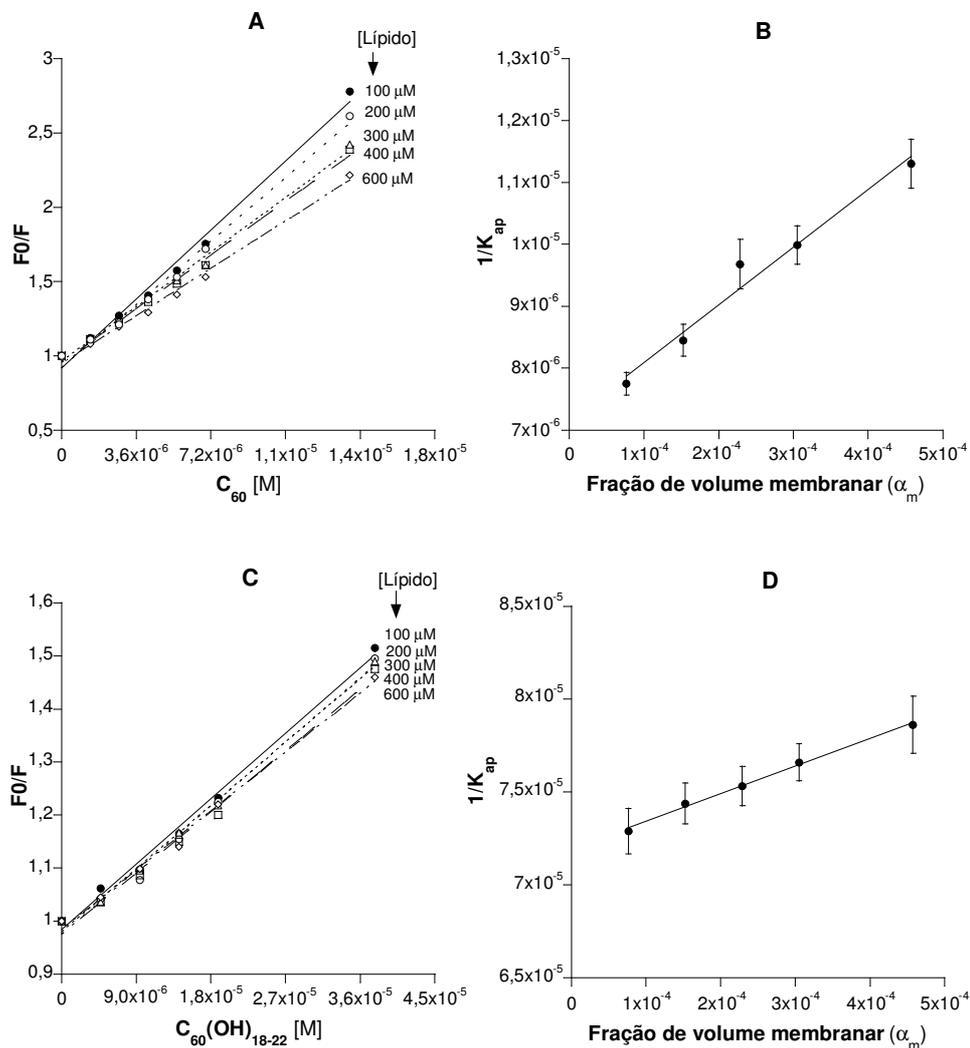


Figura 12 –Variação da supressão de fluorescência das sondas 16-AP (para C_{60}) e 2-AS (para $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$) incorporadas em membranas de DPPC (100-600 μM) na fase fluida (à temperatura de $50 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$), em função da concentração das nanopartículas de C_{60} (A) e de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ (C). Em B e D representa-se a variação do inverso dos valores de K_{ap} (determinados a partir dos declives das retas correspondentes aos melhores ajustes dos pontos experimentais representados em A e C, respetivamente) em função da fração de volume membranar (α_m), a fim de calcular os coeficientes de partilha de C_{60} (B) e $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ (D).

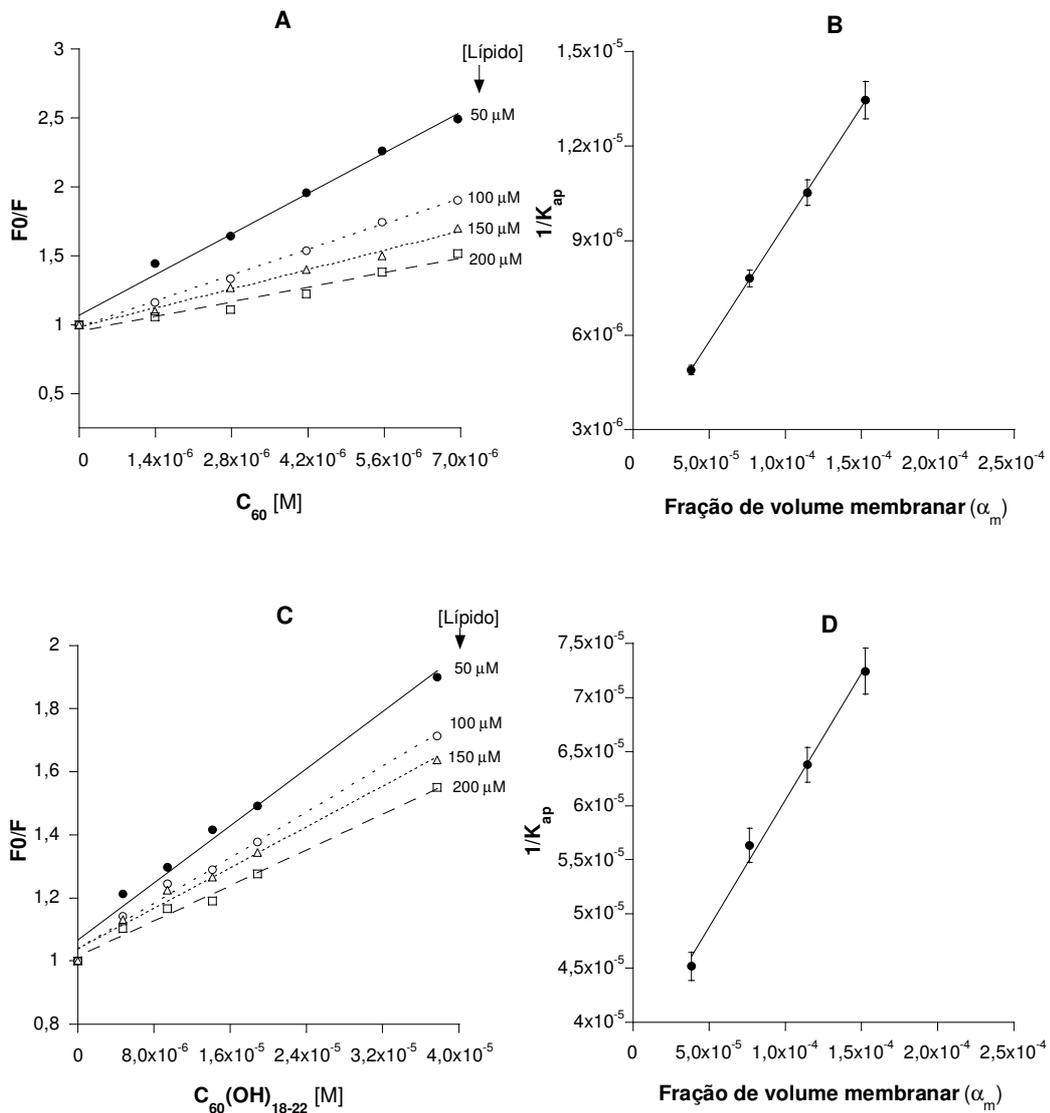


Figura 13 –Variação da supressão de fluorescência das sondas 16-AP (para C_{60}) e 2-AS (para $C_{60}(OH)_{18-22}$) incorporadas em membranas mitocondriais (50-200 μM), à temperatura de $37 \pm 0,1$ °C, em função da concentração das nanopartículas de C_{60} (A) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C). Em B e D representa-se a variação do inverso dos valores de K_{ap} (determinados a partir dos declives das retas correspondentes aos melhores ajustes dos pontos experimentais representados em A e C, respetivamente) em função da fração de volume membranar (α_m), a fim de calcular os coeficientes de partilha de C_{60} (B) e $C_{60}(OH)_{18-22}$ (D).

Tabela I - Valores da constante aparente de Stern-Volmer (K_{ap}) e do coeficiente de partilha (K_P) para as nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ em membranas de DPPC e de mitocôndrias de fígado de rato. A constante aparente de Stern-Volmer (K_{ap}) foi determinada utilizando as sondas 16-AP (para o C_{60}) e 2-AS (para o $C_{60}(OH)_{18-22}$) incorporadas em lipossomas unilamelares de DPPC e em membranas mitocondriais, para concentrações crescentes de lípido.

[DPPC] μM	C_{60} Supressão de fluorescência da sonda 16-AP		$C_{60}(OH)_{18-22}$ Supressão de fluorescência da sonda 2-AS	
	K_{ap} ($\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3$)	K_P	K_{ap} ($\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3$)	K_P
100	129161 ± 3104	1247	13719 ± 400	212
200	118372 ± 3600		13444 ± 345	
300	102305 ± 2904		13278 ± 325	
400	100177 ± 3130		13056 ± 297	
600	88512 ± 3097		12719 ± 429	
[lípidio mitocondrial] μM	K_{ap} ($\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3$)	K_P	K_{ap} ($\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3$)	K_P
50	204368 ± 6547	36003	22160 ± 625	6315
100	128207 ± 4395		17761 ± 494	
150	95105 ± 3702		15684 ± 398	
200	74389 ± 3204		13813 ± 399	

Dos resultados apresentados na Tabela I emergem alguns aspetos relevantes relativos à interação das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ com as membranas. Em primeiro lugar, ambos os fulerenos partilham extensivamente em membranas, mas a partilha de C_{60} é cerca de seis vezes superior à de $C_{60}(OH)_{18-22}$ tanto em membranas modelo de DPPC como em membranas nativas de mitocôndrias de fígado de rato. Consistentemente, outros investigadores mostraram que a adsorção do C_{60} a esferas de sílica revestidas com uma camada de fosfatidilcolinas de ovo era 3,5 vezes superior à adsorção das nanopartículas de $C_{60}(\text{ONa})_x(\text{OH})_y$ (Hou et al., 2011), sugerindo que a funcionalização da molécula de C_{60} com grupos polares produz moléculas com menor afinidade pelas biomembranas. Em segundo lugar, os coeficientes de partilha das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ nas membranas mitocondriais (36003 e 6315, respetivamente) são cerca de 30 vezes superiores aos determinados nas membranas de DPPC (1247 e 212, respetivamente). A maior afinidade dos fulerenos pelas membranas mitocondriais em relação às membranas de DPPC, sugere que a presença de proteínas e a diversidade das espécies lipídicas componentes das membranas biológicas aumentam substancialmente o volume livre na membrana acessível à incorporação dos fulerenos.

Adicionalmente, estes estudos mostraram que as nanopartículas de C_{60} e do seu derivado hidroxilado partilham em locais distintos ao longo da espessura da membrana: as de C_{60} essencialmente no centro hidrofóbico da membrana enquanto as de $C_{60}(OH)_{18-22}$ preferem regiões próximas da interface lípido-água, interagindo possivelmente com os grupos polares das moléculas lipídicas. Estudos computacionais, utilizando modelos de dinâmica molecular, efetuados para simular a interação destes fulerenos com os lípidos membranares (Li et al., 2007a; Qiao et al., 2007), corroboram as localizações membranares propostas para C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$.

3.1.3 Efeitos das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ na bioenergética mitocondrial

Cientes de que as nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ possuem diferentes características físico-químicas e interagem de diferentes formas com a membrana, pretendemos estudar o impacto dos dois tipos de fulerenos numa atividade fisiológica que, ela mesma, dependesse de um equilíbrio crítico de interações moleculares dos componentes (lípidos e proteínas) da membrana, constituindo um alvo previsível de toxicidade exercida ao nível membranar. A atividade mitocondrial foi, assim, a função celular escolhida para estes estudos, por não só satisfazer os requisitos referidos como também por ser de fácil monitorização e residir numa fração celular que é isolada com elevado grau de pureza por um procedimento simples, rápido e pouco dispendioso.

A ação das nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ ao nível da bioenergética mitocondrial foi investigada seguindo as alterações produzidas pelos fulerenos na respiração e no potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$), cujas flutuações foram promovidas por ativação do sistema respiratório com glutamato/malato (Complexo I) ou com succinato (Complexo II) e pela adição de ADP ou de um dissociador da fosforilação oxidativa (FCCP).

A interpretação do significado das alterações induzidas pelos fulerenos na velocidade de consumo de oxigénio e nas flutuações de $\Delta\Psi$ tornar-se-à mais fácil à luz da conceção plasmada na Teoria quimiosmótica da atividade mitocondrial, proposta por Peter Mitchell em 1961 (Mitchell, 2011) que, ainda hoje, é aceite nos seus princípios básicos. Assim, o processo através do qual os eletrões doados por NADH ou $FADH_2$ fluem ao longo de um sistema composto por três complexos proteicos (I,III e IV ou II, III e IV),

localizados na membrana interna mitocondrial, e dois transportadores móveis (a quinona coenzima Q e o citocromo c), até ao oxigénio molecular (acetor final, sendo reduzido a água) está intimamente associado à ejeção de prótons, da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (EIM), na qual estão implicados os complexos I, III e IV. Desta forma, a energia proveniente das reações de oxidação-redução, que decorrem da transferência de eletrões ao longo da designada “cadeia respiratória” na membrana interna mitocondrial (MIM), é conservada na forma de um gradiente eletroquímico transmembranar de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$). Este gradiente tem dois componentes: um gradiente de pH (ΔpH), pois a matriz mitocondrial adquire um pH mais alcalino devido à ejeção de prótons, e um gradiente elétrico (ou potencial transmembranar, $\Delta\Psi$) negativo no interior da mitocôndria, em virtude da saída de cargas positivas sob a forma de prótons. Assim, o gradiente eletroquímico de prótons opera no sentido favorável à entrada de prótons para a matriz mitocondrial. Como a permeabilidade da MIM a prótons é baixa, o influxo de prótons ocorre essencialmente através da enzima F_0F_1 -ATP sintase (Complexo V), constituída por duas unidades denominadas F_1 (projetando-se em direção à matriz mitocondrial) e F_o (constituída por um segmento hidrofóbico da enzima que atravessa MIM). O regresso dos prótons à matriz mitocondrial leva a uma variação negativa da energia livre (ΔG), com um valor igual ao gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$), dado pela equação:

$$\Delta\text{G} = \Delta\mu\text{H}^+ = F \Delta\Psi - 2,3 \text{ RT} \log ([\text{H}^+]_d/[\text{H}^+]_f) \quad [14]$$

em que F é a constante de Faraday (96450 C mol^{-1}), R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ JK}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (em graus Kelvin) e $[\text{H}^+]_d$ e $[\text{H}^+]_f$ são, respetivamente, as concentrações de prótons dentro e fora da mitocôndria.

Rearranjando, podemos escrever:

$$\Delta\mu\text{H}^+/F = \Delta\Psi - (2,3 \text{ RT}/F) \Delta\text{pH} \quad [15]$$

À temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, o quociente $2,3 \text{ RT}/F$ toma o valor de 59 mV , pelo que podemos escrever:

$$\Delta\mu\text{H}^+/F = \Delta\Psi - 59 \Delta\text{pH} \quad [16]$$

em que $\Delta\mu\text{H}^+/\text{F}$ (expresso em mV) toma o nome de Força Protomotriz (Δp) e reflete a força que move os prótons de retorno à matriz mitocondrial.

Segundo a hipótese de Peter Mitchell, o fluxo de prótons entre os dois espaços aquosos (matriz e EIM) da mitocôndria conduziria a um gradiente eletroquímico deslocado e a migração de prótons bem como a síntese de ATP resultavam de uma orientação adequada de uma sequência de reações químicas. Esta visão tem sido de alguma forma modificada. Por um lado, admite-se que a interface lípido-água possa constituir um condutor eficiente de prótons (Prats et al., 1986) e, por outro lado, a extrusão de prótons parece estar associada a alterações dinâmicas da conformação das proteínas envolvidas no transporte de eletrões, pelo menos no que respeita a citocromo *c*-oxidase (Verkhovsky et al., 1999). Finalmente, hoje sabe-se que a F_1F_0 -ATP sintase é uma máquina rotatória, em que a rotação da subunidade F_0 é estimulada por prótons (Nelson e Cox, 2009).

Passando agora a considerar os ensaios em laboratório com mitocôndrias isoladas em bom estado de preservação, observa-se que, quando a suspensão de mitocôndrias já consumiu os seus substratos endógenos, a adição de um substrato respiratório promove a energização das mitocôndrias criando um gradiente eletroquímico de prótons através da MIM, cuja manutenção requer o consumo contínuo de oxigénio a uma taxa relativamente pequena (respiração em estado 4). Nestas circunstâncias, quando se adiciona ADP à fração mitocondrial, a energia do gradiente eletroquímico de prótons é rapidamente utilizada pela F_0F_1 -ATP sintase para a síntese de ATP, ocorrendo a despolarização da membrana e o aumento do consumo de oxigénio (respiração em estado 3). Quando todo o ADP é consumido, o potencial transmembranar é resposto, pelo que a velocidade de consumo de oxigénio volta a baixar, passando a ser apenas a necessária para manter o gradiente eletroquímico de prótons, e as mitocôndrias regressam ao estado basal (respiração em estado 4). O quociente entre as velocidades de consumo de oxigénio em estado 3 e em estado 4 é designado por índice de controlo respiratório (ICR), o qual é considerado um indicador da integridade funcional das mitocôndrias. A adição de dissociadores energéticos como o FCCP (carbonildiciano-*p*-trifluoro-metoxifenil-hidrazona) impede a formação do gradiente eletroquímico de prótons pelo que nestas situações a taxa de consumo de oxigénio é máxima, normalmente designada por respiração dissociada (Nelson e Cox, 2009). FCCP é, de facto, um ácido fraco que atravessa facilmente a membrana externa mitocondrial, alcançando o espaço intermembranar (EIM), que é ácido devido à extrusão de prótons pelas bombas de prótons do sistema respiratório. Desta forma, FCCP fica protonado neste compartimento da mitocôndria, passando à forma não carregada. A

ausência de carga aliada à lipofilicidade desta molécula permite-lhe atravessar a MIM passando para a matriz, onde perde o próton devido à diferença de cerca de 0,6 unidades de pH entre os dois lados da MIM (Boelsterli, 2003). Na sua forma negativa, o FCCP é conduzido de regresso ao EIM atravessando a MIM, para o que se conjugam duas condições favoráveis: em primeiro lugar o potencial elétrico transmembranar negativo do lado de dentro e positivo do lado de fora; em segundo lugar, o carácter deslocalizado da carga negativa de FCCP devido à presença de anéis conjugados (Skulachev et al., 1967) que lhe permitem conservar um alto nível de lipofilicidade.

A ação de um composto ao nível da bioenergética mitocondrial pode ser, assim, esclarecida em grande medida com base em ensaios laboratoriais de consumo de oxigénio com mitocôndrias isoladas, por simples comparação das velocidades de respiração no estado 4 (V_4), no estado 3 (V_3) e no estado dissociado FCCP (V_{FCCP}), segundo a terminologia de Du e colaboradores (1998) na presença de diferentes substratos respiratórios e diferentes concentrações do composto em análise.

A Fig. 14 mostra o efeito de concentrações crescentes de nanopartículas de C_{60} (A e B) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C e D) no consumo de oxigénio e no índice de controlo respiratório (ICR), usando glutamato/malato (A e C) ou succinato (B e D) como substratos respiratórios. O glutamato/malato é um promotor da formação de NADH na matriz mitocondrial que fornece eletrões ao nível do complexo I, ativando todo o sistema de transporte de eletrões. Esta situação aproxima-se do funcionamento das mitocôndrias *in vivo*, e um valor do índice de controlo respiratório próximo de 5 na ausência de fulerenos indica uma boa preservação da integridade estrutural e funcional das preparações mitocondriais utilizadas.

Convém referir que a gama de concentrações das nanopartículas usadas nestes ensaios não foi a mesma para os dois tipos de fulerenos, sendo a gama de $C_{60}(OH)_{18-22}$ bastante mais alargada do que a de C_{60} . Isto resultou do facto da solubilidade em água das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ ser muito superior à das nanopartículas de C_{60} , tendo permitido preparar suspensões aquosas do primeiro fulereno bastante mais concentradas do que as do segundo. Assim, com $C_{60}(OH)_{18-22}$ foi possível estender os estudos até concentrações de 94 nmol/mg de proteína, sem que o volume aquoso adicionado ao meio de respiração comprometesse a velocidade de consumo de oxigénio pelo simples efeito de diluição da solução tampão. Desta forma, uma análise rigorosa dos resultados requer que consideremos duas gamas de concentração de fulerenos: uma, entre 0 a 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, que permite comparar os efeitos exercidos pelos dois fulerenos e

outra, que abrange uma gama de concentrações acima de 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, na qual apenas $C_{60}(OH)_{18-22}$ pôde ser usado. Neste trabalho, a atividade respiratória das mitocôndrias na presença de fulerenos é expressa em percentagem do controlo (ausência de nanopartículas), para normalização dos resultados.

Na gama de concentrações até 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, as nanopartícula de C_{60} promoveram uma estimulação da respiração em estado 4 e uma inibição da respiração em estado 3, em ambas as situações metabólicas estudadas, i.e. ativação por glutamato/malato e por succinato. Consequentemente, detetou-se uma diminuição progressiva e significativa do ICR com o aumento da concentração de C_{60} (Fig. 14A e B). A estimulação da respiração em estado 4 indica que a interação das nanopartículas de C_{60} com as membranas mitocondriais conduziu a um aumento da permeabilidade passiva a prótons, enquanto a inibição da respiração em estado 3 sugere efeitos ao nível dos complexos da cadeia respiratória e/ou do sistema fosforilativo. Adicionalmente, a respiração estimulada pelo FCCP, em que a fosforilação se encontra dissociada do processo oxidativo, foi progressivamente inibida pelo aumento da concentração de nanopartículas de C_{60} , confirmando a ação perturbadora das nanopartículas ao nível da cadeia respiratória (Fig. 14A e B).

Na mesma gama de concentrações, até 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ inibiram a respiração em estado 3 sem afetar de modo significativo a respiração em estado 4, promovendo um decréscimo acentuado e progressivo do ICR (Fig. 14C e D). Estes efeitos foram detetados com ambos os substratos respiratórios, apesar de terem sido mais pronunciados quando a respiração foi suportada por succinato, sugerindo efeitos específicos do fulereno ao nível do complexo II. Adicionalmente, a respiração estimulada por FCCP foi progressivamente inibida pelo aumento da concentração de nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (Fig. 14C e D). O aumento da concentração de $C_{60}(OH)_{18-22}$ acima de 20 nmol/mg de proteína mitocondrial até 94 nmol/mg de proteína mitocondrial (Fig. 14 C, D) continuou a não induzir alterações significativas na respiração em estado 4. A respiração no estado 3 continuou a decrescer, tendo-se detetado uma inibição adicional de 15,9% e 7% quando a concentração aumentou de 20 para 94 nmol/mg de proteína, na presença de glutamato/malato e succinato, respetivamente. Nas mesmas condições, a respiração dissociada pelo FCCP registou um decréscimo adicional apenas de 4,3% e 2,5% quando suportada por glutamato/malato e succinato, respetivamente. A maior inibição da respiração em estado 3 em relação à respiração dissociada sugere, assim, uma ação direta deste fulereno ao nível do sistema

fosforilativo, que poderá ter afetado para além da própria F_0F_1 -ATP sintase, o transportador de nucleótidos ADP/ATP ou o transportador de fosfato.

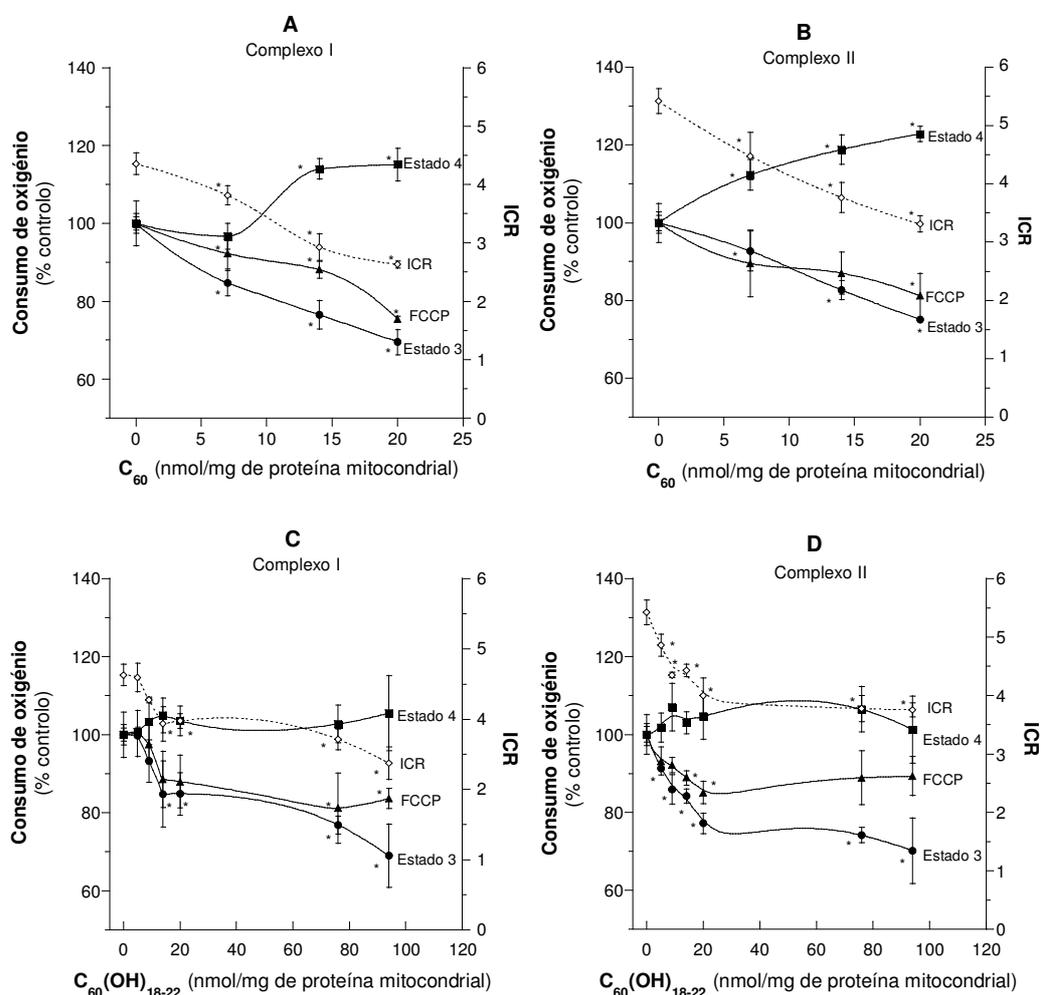


Figura 14 – Efeito da concentração de nanopartículas de C_{60} (A e B) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C e D) no consumo de oxigénio e no índice de controlo respiratório (ICR), usando glutamato/malato (complexo I; A e C) e succinato (complexo II; B e D) como substratos respiratórios. As suspensões mitocondriais (1 mg de proteína) em 1 ml de meio de reação (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, KCl 20 mM, K_2HPO_4 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, pH 7,2) foram incubadas com as nanopartículas durante 5 minutos, antes da adição de 10 mM glutamato/5 mM malato ou de 10 mM de succinato. A respiração no estado 3 (Estado 3) foi induzida por adição de ADP (150 nmol) e a respiração no estado 4 (Estado 4) foi registada após consumo completo de ADP. A respiração dissociada (FCCP) foi induzida por adição de FCCP (1 μ M). Os valores médios de consumo de oxigénio (em nmol O_2 /min/mg de proteína mitocondrial) nas preparações controlo foram os seguintes: $30,05 \pm 0,52$ (Estado 3); $6,9 \pm 0,18$ (Estado 4) e $47,41 \pm 2,75$ (FCCP) na presença de glutamato/malato e $61,48 \pm 1,22$ (Estado 3); $11,35 \pm 0,32$ (Estado 4) e $130,43 \pm 6,59$ (FCCP) na presença de succinato. Cada valor experimental representa a média \pm desvio-padrão de 6 ensaios independentes (utilizando preparações mitocondriais diferentes). Os valores obtidos na presença de nanopartículas foram comparados com o controlo, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. * $p < 0,05$.

Em suma, comparando as perturbações induzidas na respiração mitocondrial pelos fulerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ na mesma gama de concentrações (0 – 20 nmol/mg de proteína), há alguns aspetos a realçar. Em primeiro lugar, apenas as nanopartículas de C_{60} aumentaram de modo significativo a respiração em estado 4 e, de uma forma geral, os efeitos induzidos na respiração mitocondrial pelas nanopartículas de C_{60} foram mais severos dos que os promovidos pelas nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ na mesma gama de concentrações. Tal facto pode, em maior ou menor extensão, refletir a maior partilha do fulereno C_{60} nas membranas mitocondriais (coeficiente de partilha 6 vezes superior ao do $C_{60}(OH)_{18-22}$), com repercussão nas concentrações efetivas ao nível da membrana. Por exemplo, para uma concentração de fulerenos global de 20 nmol/mg de proteína (20 μ M), a concentração estimada na membrana mitocondrial é 63 mM para C_{60} e de 40,7 mM para $C_{60}(OH)_{18-22}$. Todavia, o aumento da concentração de $C_{60}(OH)_{18-22}$ de 20 para 94 nmol/mg de proteína mitocondrial não produziu qualquer efeito adicional detetável na respiração em estado 4 das mitocôndrias. A estimulação da respiração em estado 4 é geralmente interpretada como resultando de um aumento da permeabilidade da MIM a prótons (“*proton leak*”), resultante de perturbações no grau de compactação dos lípidos e na organização dinâmica da membrana. Tendo em consideração os efeitos diferenciais dos dois fulerenos no estado 4 da respiração mitocondrial, as propriedades biofísicas das membranas mitocondriais deverão ter sido mais afetadas pelas nanopartículas de C_{60} do que pelas de $C_{60}(OH)_{18-22}$. A não dever-se a superioridade dos efeitos de C_{60} face ao seu congénere hidroxilado a diferentes concentrações efetivas ao nível da membrana, a localização distinta das nanopartículas através da espessura da bicamada poderão estar na origem desse fenómeno. Desta forma, mais do que a concentração efetiva dos fulerenos na membrana interna mitocondrial, a sua distribuição transversal na bicamada deve ser decisiva para a eficiência das perturbações nas propriedades biofísicas que regulam a permeabilidade da membrana aos prótons. Assim, as nanopartículas de C_{60} localizando-se no interior hidrofóbico da bicamada devem ter causado maior distúrbio na organização dos lípidos membranares do que as do fulereno hidroxilado que se localizam em regiões mais polares, próximas da superfície da bicamada.

Por outro lado, para ambos os fulerenos na gama de concentrações até 20 nmol/mg de proteína, a inibição da respiração em estado 3 teve uma extensão idêntica à inibição da respiração dissociada pelo FCCP, sugerindo que os efeitos primários dos dois fulerenos ocorrem ao nível do sistema de transporte de eletrões. Contudo, tais efeitos, embora podendo refletir uma interação direta dos fulerenos com alguns componentes dos

complexos do sistema respiratório, poderão igualmente ter resultado de uma ação indireta, mediada por perturbações das propriedades físicas da bicamada lipídica, que terão comprometido a estabilidade dos complexos ou as suas interações.

Os efeitos dos fulerenos na eficiência bioenergética mitocondrial também foram avaliados através das perturbações no potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) ativando as mitocôndrias com glutamato/malato ou com succinato. Exemplos de registos típicos são apresentados na Fig. 15. Na ausência de fulerenos, a energização promovida por qualquer um dos substratos respiratórios conduziu ao rápido desenvolvimento de um $\Delta\Psi$ de cerca de 210 mV (negativo no interior), característico do estado respiratório 4. A adição de ADP (início do estado 3) promoveu a queda imediata do $\Delta\Psi$ em cerca de 28 mV. Após um curto período de tempo, necessário para a fosforilação do ADP, as mitocôndrias recuperaram o $\Delta\Psi$ para valores próximos dos observados antes da adição do ADP.

Na gama de concentrações utilizada, nenhum dos fulerenos afetou significativamente o $\Delta\Psi$ das mitocôndrias desenvolvido por ativação com glutamato/malato ou succinato. No entanto, ambos os fulerenos diminuíram a extensão da despolarização induzida por ADP, na presença de ambos os substratos respiratórios usados (Figura 15, Tabelas II e III). Na gama de concentrações até 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, as nanopartículas de C_{60} exerceram efeitos significativamente mais pronunciados do que as suas congéneres hidroxiladas. Por exemplo, para a concentração de 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, as nanopartículas de C_{60} decresceram a despolarização induzida por ADP em 31% e 35% quando a energização foi suportada por glutamato/malato e succinato, respetivamente, enquanto as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ reduziram, nas mesmas condições, a despolarização em apenas 3,7% e 7,2%, respetivamente. No entanto, o aumento da concentração de $C_{60}(OH)_{18-22}$ até 94 nmol/mg de proteína mitocondrial acentuou os efeitos sobre a despolarização induzida por ADP. De facto, detetou-se, para a máxima concentração usada de $C_{60}(OH)_{18-22}$, uma redução semelhante à induzida por C_{60} a 20 nmol/mg de proteína mitocondrial (Tabelas II e III). Assim, ambos os fulerenos mostraram a capacidade de afetar a eficiência fosforilativa das mitocôndrias, apesar do C_{60} promover os mesmos efeitos a concentrações inferiores.

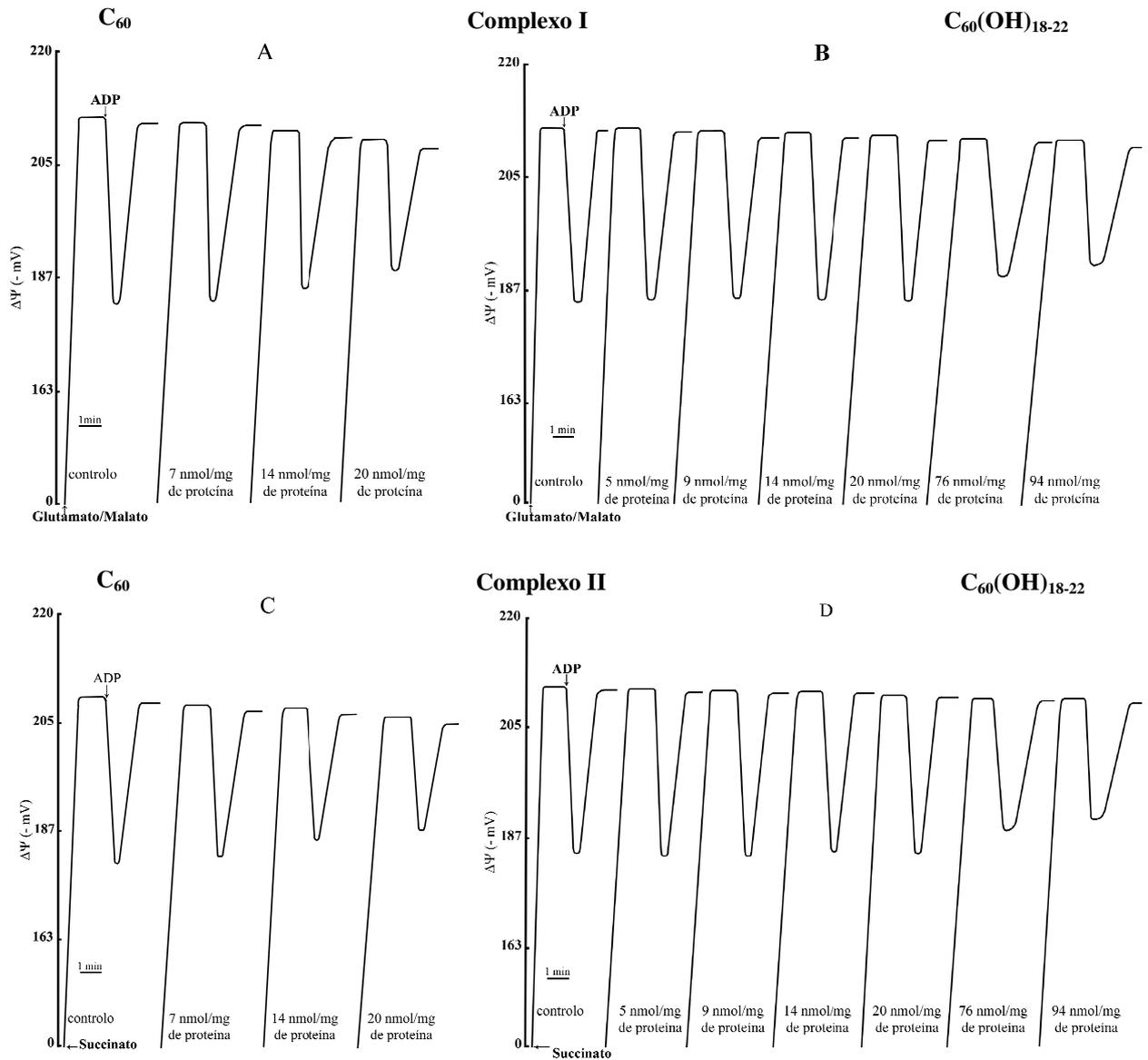


Figura 15 – Registos típicos do potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de fígado de rato energizadas com glutamato/malato (A, B) ou succinato (C, D), na ausência (controlo) ou na presença de concentrações crescentes de nanopartículas de C₆₀ (A, C) e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (B, D), à temperatura de 30 °C. A fração mitocondrial (1 mg de proteína) foi ressuspensa em 1 ml de meio de reação (sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, KCl 20 mM, K₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,2) contendo 3 μ M de TPP⁺ e incubada com as nanopartículas durante 5 min, antes da adição dos substratos respiratórios (10 mM glutamato/5 mM malato ou 10 mM succinato). A fosforilação foi iniciada com a adição de 150 nmol de ADP.

Capítulo 3 – Resultados

Adicionalmente, a concentrações elevadas, $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ também aumentou o tempo necessário para ocorrer a repolarização (i.e. o tempo necessário para que todo o ADP adicionado às suspensões mitocondriais seja fosforilado), embora $\Delta\Psi$ de repolarização não tenha sido afetado de um modo significativo. Este efeito indica um menor grau de associação entre as reações de oxidação-redução no sistema de transporte de elétrons e a fosforilação do ADP ao nível da F_0F_1 -ATP sintase, situação que, associada à menor amplitude de despolarização induzida pelo ADP, constitui uma evidência robusta de que a síntese de ATP foi significativamente afetada por concentrações elevadas de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$. Efeitos semelhantes na bioenergética mitocondrial foram obtidos com nanopartículas de prata com dimensões de 40 e 80 nm (Teodoro et al., 2011), a concentrações até 7 nmol/mg de proteína.

Tabela II – Efeito da concentração de nanopartículas de C_{60} no potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de fígado de rato na presença de glutamato/malato (complexo I) e de succinato (complexo II).

C_{60} (nmol/mg de proteína)		$\Delta\Psi$ (-mV) ^a		
		Após energização pelo glutamato/malato ou succinato	Após despolarização pelo ADP	Após repolarização
0	Complexo I	213,20 ± 3,91	28,67 ± 0,98	212,15 ± 4,15
7		213,30 ± 2,89	28,13 ± 0,77	212,46 ± 2,76
14		211,73 ± 2,67	23,25 ± 1,77*	210,56 ± 2,81
20		210,84 ± 2,83	19,66 ± 1,22*	209,04 ± 3,03
0	Complexo II	209,46 ± 0,41	28,55 ± 2,44	208,12 ± 0,99
7		207,85 ± 1,25	26,87 ± 1,97	206,90 ± 1,52
14		207,28 ± 1,68	22,32 ± 1,69*	205,75 ± 2,47
20		206,06 ± 2,43	18,47 ± 1,2*	203,88 ± 3,63

^a Cada valor experimental representa a média ± desvio padrão de 6 ensaios independentes (utilizando preparações mitocondriais diferentes). Os valores obtidos na presença de nanopartículas foram comparados com o controle, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p<0,05.

Tabela III – Efeito de concentração de nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ no potencial elétrico transmembranar ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de fígado de rato na presença de glutamato/malato (complexo I) e de succinato (complexo II).

C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂ (nmol/mg de proteína)		$\Delta\Psi$ (-mV) ^a		
		Após Energização pelo glutamato/malato ou succinato	Após Despolarização pelo ADP	Após Repolarização
0	Complexo I	210,18 ± 1,41	27,18 ± 1,34	209,93 ± 1,64
5		210,13 ± 1,16	26,96 ± 1,51	209,79 ± 1,36
9		209,57 ± 1,23	26,54 ± 1,65	209,26 ± 1,67
14		209,31 ± 1,29	26,71 ± 2,48	209,04 ± 1,48
20		208,81 ± 1,22	26,19 ± 1,44*	208,69 ± 1,52
76		208,67 ± 1,25	22,55 ± 2,16*	208,42 ± 1,68
94		208,78 ± 1,25	18,91 ± 1,00*	208,21 ± 1,61
0	Complexo II	209,17 ± 1,12	27,63 ± 1,36	208,76 ± 1,31
5		208,52 ± 1,25	27,39 ± 1,26	208,26 ± 1,25
9		208,25 ± 1,24	26,92 ± 1,09	208,02 ± 1,23
14		207,96 ± 1,30	26,18 ± 0,95	207,89 ± 1,36
20		207,52 ± 1,17*	25,58 ± 1,42*	207,49 ± 1,14
76		207,09 ± 1,27*	20,86 ± 0,71*	207,00 ± 1,19*
94		206,63 ± 1,40*	19,51 ± 0,65*	206,52 ± 1,31*

^a Cada valor experimental representa a média ± desvio padrão de 6 ensaios independentes (utilizando preparações mitocondriais diferentes). Os valores obtidos na presença de nanopartículas foram comparados com o controle, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p<0,05

De forma a caracterizar o efeito das nanopartículas na atividade da F₀F₁-ATP sintase, foi avaliada a reação inversa da síntese de ATP (ou seja a atividade hidrolítica de F₀F₁-ATPase), a qual associa a hidrólise do ATP a um fluxo vetorial de prótons. A Fig. 16 mostra que ambos os fulerenos, na gama de concentração até 20 nmol/mg de proteína mitocondrial não afetaram a atividade da F₀F₁-ATPase. Na gama de concentrações superiores a 20 nmol/mg de proteína mitocondrial, as nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ reduziram, porém, de um modo significativo a atividade de clivagem de ATP das mitocôndrias, detetando-se uma inibição de 30% na atividade enzimática para a maior concentração testada de fulereno (Fig. 16). Este facto está em perfeita concordância com o reportado atrás, de que, a concentrações elevadas (> 20 nmol/mg de proteína mitocondrial), as nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ promoveram uma inibição da respiração em estado 3 bastante superior à induzida na respiração dissociada por FCCP, indicando que, nesta gama de concentrações, aquelas nanopartículas, para além de afetarem os complexos respiratórios, também exerceram uma ação ao nível do sistema fosforilativo.

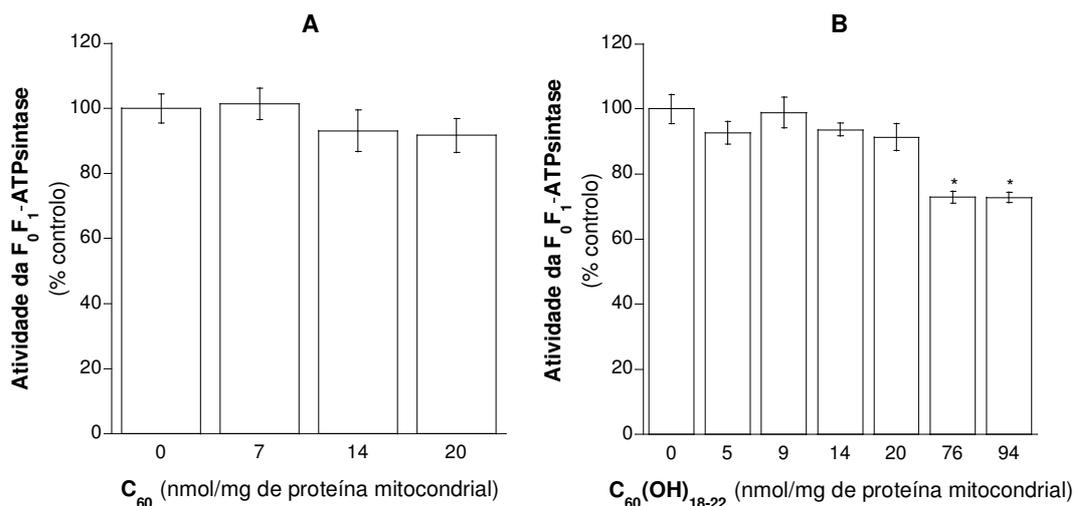


Figura 16 – Efeito das nanopartículas de C₆₀ (A) e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (B) na atividade enzimática da F₀F₁-ATPase de mitocôndrias de fígado de rato, avaliada em termos da hidrólise de ATP e representada em % do controle (preparação mitocondrial não incubada com nanopartículas). O valor experimental obtido para o controle foi de 115 ± 5 nmol H⁺/min/mg de proteína mitocondrial. Cada valor experimental representa a média ± desvio-padrão de 6 ensaios independentes (utilizando preparações mitocondriais diferentes). Os valores obtidos na presença de nanopartículas foram comparados com os valores do controle, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p<0,05.

Em suma, os resultados obtidos neste capítulo são reveladores, no seu conjunto, de que a química superficial dos fulerenos influencia as suas interações com as membranas biológicas (refletindo-se por diferentes valores de partilha e distintas localizações na bicamada) e, de forma provavelmente relacionada, os seus efeitos na bioenergética mitocondrial. Estes traduzem-se por perturbações na fosforilação de ADP na mitocôndria, responsável pela produção de mais de 95% da energia necessária ao normal funcionamento da célula, com previsíveis repercussões adversas no organismo.

3.2 O impacto ecológico das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂: Utilização de um microrganismo procariótico (*Geobacillus stearothermophilus*) e de um organismo eucariótico (*Lemna gibba*) como sistemas-modelo para rastreamento de ecotoxicidade

Com a utilização dos fulerenos em vários setores de produção industrial e a sua expansão aos mais diversos produtos comerciais, tem-se assistido nos últimos anos ao aparecimento desses materiais no ambiente, invadindo diversos nichos ecológicos, entre os quais ecossistemas aquáticos, devido à descarga de águas residuais contendo esses compostos, com previsíveis consequências desastrosas para o equilíbrio ecológico.

Em virtude da dispersão destes materiais nano-estruturados no ambiente ser bem mais recente (restringindo-se às duas últimas décadas) do que a dos inseticidas e herbicidas químicos (remontando à segunda metade do século passado), o conhecimento dos efeitos nefastos dos fulerenos é bem mais escasso do que o relativo a outros poluentes ambientais e a experiência em avaliar a sua toxicidade por testes *in vitro* também é incomparavelmente menor.

Neste contexto, propusemo-nos avaliar comparativamente a toxicidade das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ utilizando modelos que estavam bem estabelecidos no nosso laboratório para o rastreamento de toxicidade de compostos químicos contaminantes de ambientes naturais, nomeadamente, inseticidas como o DDT, endossulfão e metopreno e herbicidas como o alacloro e o linurão (Donato et al., 1997b; Martins et al., 2003; Monteiro et al., 2005; Jurado et al., 2012). Os modelos biológicos escolhidos foram a bactéria Gram-positiva *Geobacillus stearothermophilus* e a planta aquática *Lemna gibba*, ambos representantes de organismos que assumem um papel importante nas cadeias alimentares dos ecossistemas em que habitam. A *Lemna gibba* ocupa, ela mesma, o nível trófico dos produtores nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos e a bactéria *G. stearothermophilus* representa os microrganismos que constituem um elemento-chave na reciclagem dos nutrientes em qualquer ecossistema. É desta forma previsível que agentes perturbadores do desenvolvimento destes organismos, ou dos organismos que eles representam nos estudos *in vitro*, terão consequências nefastas para o funcionamento normal dos ecossistemas. Se, por um lado, *Lemna gibba* é um organismo perfeitamente estabelecido como modelo em estudos de fitotoxicidade (EPA, 1996), a eubactéria termofílica *G. stearothermophilus* tem sido extensivamente utilizada no nosso laboratório

em estudos toxicológicos, tendo inclusivamente prestado um contributo importante ao revelar que distúrbios causados no estado físico da membrana podiam estar na base dos mecanismos moleculares de toxicidade de uma grande diversidade de compostos químicos (Donato et al., 1997b, 2000; Luxo et al., 1998).

Assim, no trabalho a que concerne o presente capítulo desta dissertação, foram avaliados os efeitos dos fulerenos ao nível do crescimento e da atividade respiratória de *G. stearothermophilus* e ao nível do crescimento, da atividade fotossintética e do conteúdo em clorofilas da *Lemna gibba*.

3.2.1 Caracterização física das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ em suspensão em meios de diferente composição

O estudo da atividade toxicológica dos fulerenos C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, tomando a bactéria *G. stearothermophilus* e a planta aquática *Lemna gibba* como modelos, foi precedido da caracterização física das nanopartículas (no que respeita ao tamanho e ao potencial Zeta) em água (meio da suspensão original e de armazenamento das nanopartículas) e após diluição de amostras concentradas das suspensões aquosas de nanopartículas nos meios utilizados neste estudo, a saber: meio L-Broth, com uma composição complexa que inclui vários compostos orgânicos (ver secção de Material e Métodos) para o crescimento de *G. stearothermophilus*; meio Hutner, constituído por vários sais (nitrato de potássio, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, di-hidrogenofosfato de potássio, citrato férrico, EDTA disódico, ácido bórico, sulfato de magnésio, sulfato de zinco, sulfato de cobre e molibdato de sódio), para o desenvolvimento de *Lemna gibba*; meio de reação dos protoplastos (tampão HEPES-Tris com cloreto de magnésio) para os ensaios de respiração bacteriana e meio de reação dos cloroplastos (tampão de tricina-NaOH, sorbitol e cloreto de magnésio) para os ensaios de fotossíntese com *Lemna gibba*.

O potencial Zeta negativo exibido por ambos os fulerenos em água (de $-24,6 \pm 3,8$ mV e $-35,7 \pm 4,0$ mV para C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, respetivamente) não foi significativamente afetado após diluição das nanopartículas nos meios de crescimento ou de respiração e fotossíntese. Todavia, no que se refere às dimensões, registaram-se alterações apreciáveis, tendo-se observado os maiores tamanhos das nanopartículas, tanto de C₆₀ como de

$C_{60}(OH)_{18-22}$, no meio Hutner, e os menores, no meio de reação dos cloroplastos. As dimensões das nanopartículas de ambos os fulerenos praticamente duplicaram quando foram transferidas para o meio de crescimento de *Lemna gibba*, sugerindo a formação de agregados que poderão ter sido propiciados pela elevada força iônica deste meio (Brant et al., 2005).

Realça-se que, dada a importância no presente trabalho de excluir efeitos tóxicos de eventuais resíduos de solventes orgânicos, mais precisamente de tolueno, utilizado na preparação da suspensão aquosa do fulereno C_{60} , as suspensões de nanopartículas de C_{60} foram também analisadas por GC/MS após microextração em fase sólida (ver secção de Material e Métodos), tendo revelado concentrações de tolueno inferiores ao limite de detecção, isto é, 0,1 ng/ml.

Tabela IV – Dimensões e potencial Zeta das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ em suspensão em água e em meios de diferente composição: meio L-Broth usado no crescimento de *G. stearotherophilus*; meio Hutner para o desenvolvimento de *Lemna gibba* e meios de reação usados nos ensaios de respiração com protoplastos e de fotossíntese com cloroplastos.

Meios de suspensão das nanopartículas ¹	C_{60}		$C_{60}(OH)_{18-22}$	
	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)
Água	32,8 ± 4,9	- 24,6 ± 3,8	2,9 ± 0,3	- 35,7 ± 4,0
Meio L-Broth	34,9 ± 3,5	- 21,8 ± 1,9	2,7 ± 0,2	- 36,4 ± 3,9
Meio de reação dos protoplastos	43,4 ± 5,6	- 20,8 ± 4,9	3,1 ± 0,4	- 33,9 ± 4,0
Meio Hutner	78,5 ± 8,2	- 21,7 ± 1,3	5,1 ± 0,8	- 34,3 ± 4,1
Meio de reação dos cloroplastos	28,0 ± 3,1	- 20,8 ± 4,1	1,4 ± 0,2	- 34,2 ± 4,0

¹ Ver composição dos meios na secção de Material e Métodos.

3.2.2 Avaliação da toxicidade das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ num microrganismo procariótico (*Geobacillus stearothermophilus*)

Com o objetivo de investigar a toxicidade das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ em microrganismos procarióticos, utilizou-se uma bactéria termofílica do género *Geobacillus* que, embora sem grande relevância ecológica (em virtude do seu habitat se restringir a ambientes de temperatura superior a 45 °C), se tem revelado um bom modelo para rastrear a toxicidade de poluentes em estudos efetuados no nosso laboratório (ver Capítulo 4 de Discussão).

Tomaram-se como indicadores de toxicidade das nanopartículas de fulereno os parâmetros de crescimento (duração da fase latente, taxa específica de crescimento, densidade celular das culturas no início da fase estacionária) e da atividade respiratória da bactéria (velocidade de consumo de oxigénio por protoplastos isolados da bactéria, utilizando NADH como substrato respiratório) que haviam mostrado variações coerentes com o nível de toxicidade de poluentes conhecidos e testados noutros modelos biológicos (Donato et al., 1997a; Monteiro et al., 2005; Pereira et al., 2009).

3.2.2.1 Efeitos das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ no crescimento de *Geobacillus stearothermophilus*

A Fig. 17 mostra os efeitos do aumento da concentração dos fulerenos no crescimento de *G. stearothermophilus* em meio L-Broth à temperatura de 65 °C, temperatura ótima de crescimento desta bactéria (Jurado et al., 1987). Na gama de concentrações de 2 a 15 mg/L, as nanopartículas de C₆₀ não afetaram significativamente o crescimento de *G. stearothermophilus* (Fig. 17A), embora à concentração máxima ensaiada (15 mg/L) se tenha verificado um decréscimo significativo, cerca de 6%, na densidade celular máxima da cultura atingida em fase estacionária (Fig. 17B). A fase de latência e a taxa específica de crescimento de *G. stearothermophilus* (Fig. 17A e B) não foram perturbadas pela presença destas nanopartículas. De forma similar, a adição de nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ ao meio de cultura, na gama de concentrações de 5 a 200 mg/L, não afetou o crescimento daquele microrganismo (Fig. 17C). Neste caso, nenhum dos parâmetros que habitualmente são tomados como indicadores de perturbações causadas

por agentes externos no crescimento bacteriano, isto é, a duração da fase de latência, a taxa específica de crescimento e a densidade celular máxima alcançada pela cultura em fase estacionária (ver anexo I), sofreu alterações na presença das nanopartículas, na gama de concentrações ensaiada (Fig. 17D).

É de realçar que, para prevenir eventuais interferências das suspensões de nanopartículas nas leituras de densidade óptica (D.O.) a 610 nm, com que foi feita a monitorização do crescimento bacteriano em meio líquido, foram usadas como brancos (para ajuste da D.O. a zero) amostras retiradas de frascos com meio de crescimento não inoculado, contendo nanopartículas (C_{60} ou $C_{60}(OH)_{18-22}$) às mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de crescimento e incubados nas mesmas condições das culturas bacterianas (temperatura de 65 °C e agitação com vaivém a 100 cursos por minuto). Os valores de D.O. obtidos com essas amostras foram sempre muito baixos e não variaram ao longo da experiência, denotando estabilidade coloidal e ausência de aglomeração das nanopartículas.

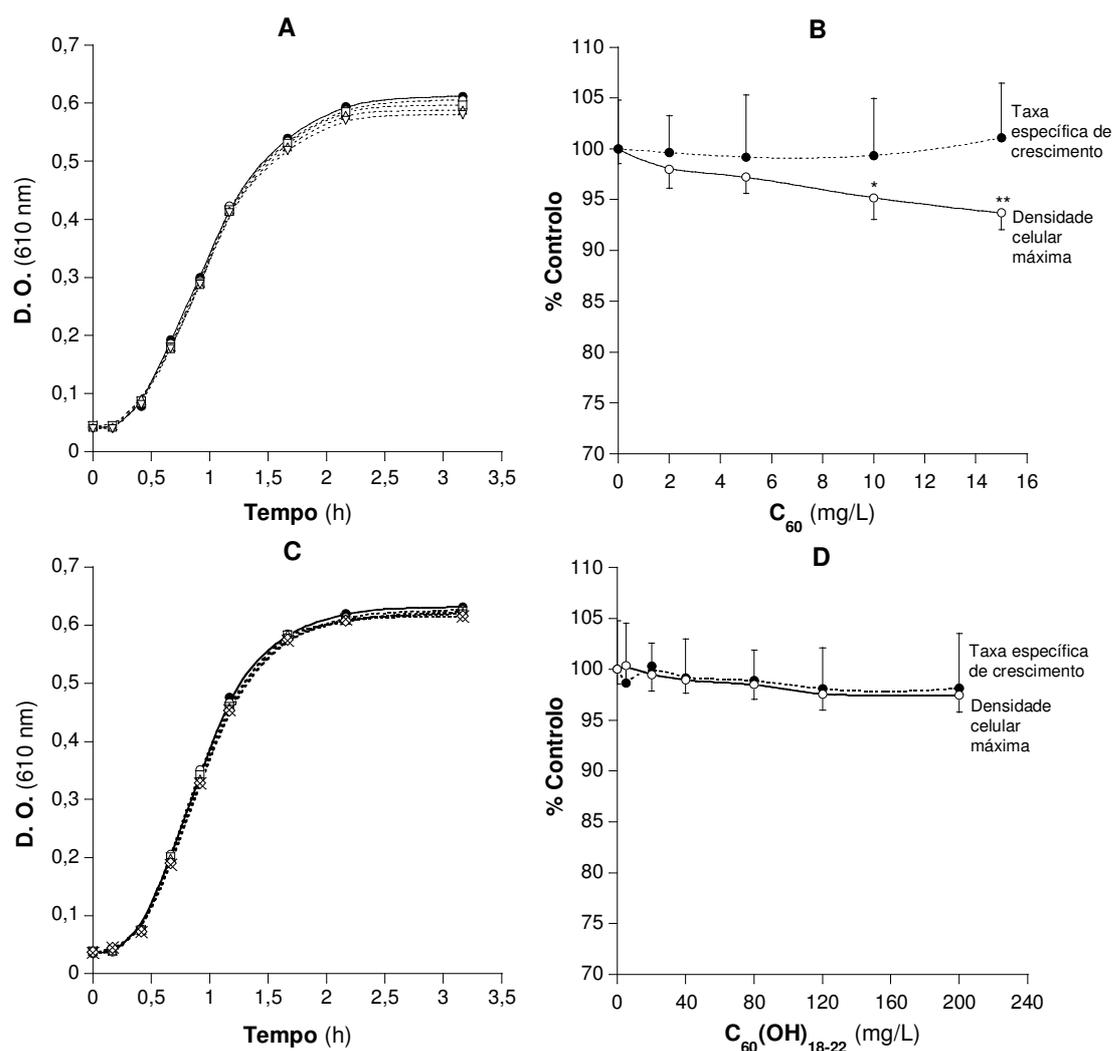


Figura 17 – Efeito da concentração de nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ no crescimento de culturas de *G. stearothermophilus*, à temperatura de 65 °C. As bactérias foram cultivadas em meio L-Broth na ausência (●) ou na presença das nanopartículas de C₆₀ (A) às concentrações de 2 mg/L (○), 5 mg/L (□), 10 mg/L (△) e 15 mg/L (▽) e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (C) às concentrações de 5 mg/L (○), 20 mg/L (□), 40 mg/L (△), 80 mg/L (▽), 120 mg/L (◇) e 200 mg/L (×). O crescimento foi seguido por turbidimetria (pseudo-absorvência), fazendo leituras da densidade ótica (D. O.) a 610 nm, a intervalos de tempo regulares. Em A e C, representam-se as curvas de crescimento de *G. stearothermophilus* referentes a uma experiência típica de três ensaios independentes. Em B e D, estão representadas as taxas específicas de crescimento (●) e os valores de densidade celular máxima atingidos pelas culturas de *G. stearothermophilus* em fase estacionária (○), na presença de concentrações crescentes de nanopartículas de C₆₀ (B) e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (D). Estes valores (média ± desvio-padrão de 3 ensaios independentes) estão expressos em percentagem do controlo (crescimento de *G. stearothermophilus* na ausência de fulerenos) e foram comparados com os valores do controlo utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”, *p < 0,05 e **p < 0,01.

De forma a complementar os estudos de crescimento bacteriano com informação referente ao aspeto morfológico das células, foi levada a cabo a caracterização ultra-estrutural das células de *G. stearothermophilus* recolhidas na fase exponencial de crescimento (após 60 min de crescimento) a partir de culturas em meio basal (como controlo) e em meios a que se tinha adicionado cada um dos fulerenos à concentração máxima testada nos ensaios de crescimento, por microscopia eletrónica de transmissão (Fig. 18).

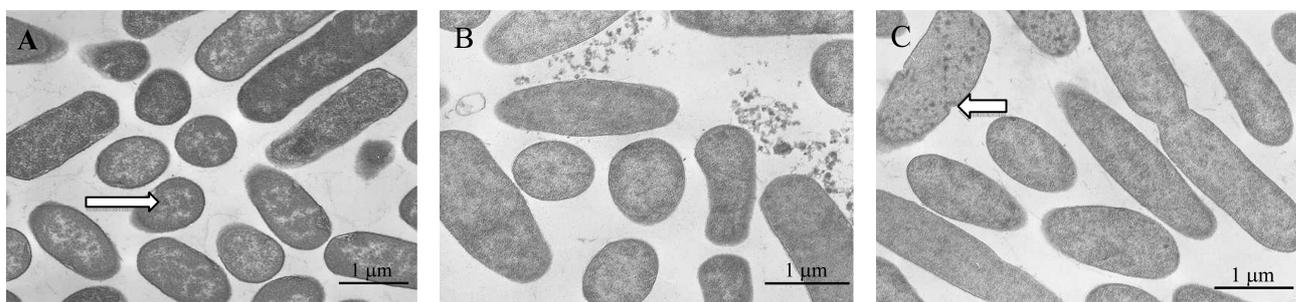


Figura 18 – Imagens de microscopia eletrónica de transmissão de células de *G. stearothermophilus* recolhidas na fase exponencial de crescimento de culturas realizadas na ausência de nanopartículas (A), na presença de 15 mg/L de nanopartículas de C_{60} (B) e na presença de 200 mg/L de nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C).

A Fig. 18 mostra que os fulerenos não causaram alterações estruturais nas células de *G. stearothermophilus*. A população de células bacterianas revelou-se bastante uniforme, com a morfologia típica em bastonete, incluindo múltiplas células em divisão celular, como se deduz da formação de um septo transversal a partir da periferia, mais ou menos na região central da célula-mãe (ver seta no painel C). A parede celular apresentou continuidade e o aspeto característico, com uma camada externa (camada-S) de natureza fibrilar e difusa, provavelmente por ser formada por uma rede de glicoproteínas (Egelseer et al., 1998) e uma camada interna, constituída pelo peptidoglicano, homogeneamente compacta e electronodensa, separada da membrana plasmática por uma região estreita electronotransparente (ver ampliação maior no anexo II). A membrana plasmática, fortemente contrastada pela técnica de fixação, revelou-se contínua e com um perfil assimétrico que foi preservado na presença dos fulerenos. O citoplasma finamente

granulado, com os ribossomas homogeneamente distribuídos, apresentou uma região electronotransparente com fibrilhas evidentes, identificada como correspondendo ao nucleóide (ver seta no painel A).

Estudos prévios no nosso laboratório tinham mostrado que compostos com uma ação fortemente inibitória do crescimento desta bactéria, como por exemplo os inseticidas DDT (Donato et al., 1997b) e metopreno (Monteiro et al., 2008b), promoviam alterações ultra-estruturais marcantes nas células bacterianas, traduzindo-se por: i) modificação do perfil da membrana plasmática de assimétrico para simétrico e, em casos mais drásticos, aparecimento de descontinuidades ou rotura da membrana celular, eventualmente acompanhada de fraturas na parede celular e perda de material citoplasmático; ii) aparecimento no interior da célula de massas densas de material amorfo em resultado da floculação da matriz citoplasmática; iii) nucleóide e ribossomas pouco evidentes. No anexo II, mostram-se imagens de *Geobacillus stearothermophilus* com o propósito de comparar algumas destas características em células controlo e células expostas ao inseticida DDT.

Outro aspeto evidenciado nas microfotografias de *Geobacillus stearothermophilus* na presença de C₆₀ (Fig. 18, painel B) diz respeito à aparente aglomeração das nanopartículas no exterior das células. É, no entanto, de realçar que esta aglomeração não foi observada no decurso das experiências de crescimento em meio líquido, como já foi referido atrás. A aglomeração de C₆₀ que aparece no material de inclusão das amostras biológicas para Microscopia eletrónica deve ter ocorrido na sequência do processo de centrifugação para recolha das células tratadas com gluteraldeído (ver secção de Material e Métodos). Assim, a hipótese que legitimamente poderia ser formulada com base nestas observações, isto é, de que a ausência de efeitos das nanopartículas de C₆₀ no crescimento e na morfologia das bactérias poderia resultar da agregação das partículas, diminuindo a sua acessibilidade às células, não é suportada pelos estudos turbidimétricos. Por outro lado, os resultados de partilha em membranas de mitocôndrias de rato (secção 3.1) revelaram a forte incorporação do fulereno C₆₀ nestas membranas, apreciavelmente maior do que a observada em bicamadas constituídas por um único lípido (DPPC). Atendendo a que a membrana de *G. stearothermophilus* é constituída por lípidos bem representados nas membranas mitocondriais (fosfatidiletanolmina, fosfatidilglicerol e cardiolipina) (Jurado et al., 1991) e contém uma elevada densidade molecular de proteínas, é previsível que a partilha das nanopartículas de C₆₀ seja igualmente grande nas membranas desta bactéria. A acreditar que as nanopartículas incorporam na membrana na sua forma molecular ou de agregados muito pequenos, como previamente discutido na secção 3.1, também não

surpreende que as mesmas não tenham aparecido evidentes nas células observadas por Microscopia electrónica, por falta de resolução da técnica. Por outro lado, estas células são rodeadas por uma parede celular de peptidoglicano. Tendo em conta esta característica das bactérias, duas novas hipóteses aparecem como plausíveis no estado de conhecimento atual. A primeira prevê que as nanopartículas tenham o seu acesso à membrana celular comprometido por serem fortemente adsorvidas pela parede bacteriana constituída por peptidoglicano (formado por cadeias lineares de N-acetilglucosamina e ácido-n-acetil-murâmico, interligadas por peptídeos curtos), devido a interações que estabeleceriam com resíduos de aminoácidos e hidratos de carbono da parede. A segunda hipótese parte do princípio de que a parede celular das bactérias não se opõe à entrada livre das nanopartículas de C_{60} , da mesma forma que não impede o acesso de vários tipos de moléculas (por exemplo nutrientes) ao interior da célula, ou, alternativamente, que existe um equilíbrio dinâmico entre as moléculas de C_{60} que ficam presas à rede de peptidoglicano e as que ficam no espaço periplásmico, eventualmente em equilíbrio com pequenos aglomerados, e, dessa forma, antevê que as nanopartículas possam atingir a membrana das células e, eventualmente, o seu interior.

A fim de esclarecer qual o papel da parede no acesso das nanopartículas de fulereno à membrana celular da bactéria, ou pelo menos contribuir para esse esclarecimento, as experiências seguintes foram levadas a cabo em protoplastos (células sem parede), sendo, neste caso, a acessibilidade das nanopartículas à membrana (hospedeira dos complexos respiratórios da bactéria) inferida de forma indireta, *i.e.*, através da eventual inibição da atividade respiratória da célula.

3.2.2.2 Efeitos das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ na atividade respiratória de *Geobacillus stearothermophilus*

A par com o crescimento, a atividade respiratória de *Geobacillus stearothermophilus* tem-se revelado muito sensível ao efeito perturbador de moléculas lipofílicas que incorporam fortemente na membrana (Donato et al., 1997a; Monteiro et al., 2005). O sistema respiratório responsável pela fosforilação oxidativa desta bactéria reside na membrana citoplasmática que, como em todas as bactérias *Gram*-positivas, é a única membrana da célula. A atividade respiratória destas bactérias pode, assim, ser

monitorizada em protoplastos obtidos facilmente a partir das células, por lise enzimática da parede celular de peptidoglicano, utilizando lisozima. A vantagem de usar protoplastos em vez das células intactas, nos estudos de respiração, reside no facto de ser assim eliminada a barreira eventualmente imposta pela parede celular ao acesso de substratos e dos compostos em análise aos complexos do sistema respiratório. Por outro lado, estudos toxicológicos com protoplastos de *Geobacillus stearothermophilus* têm permitido obter no nosso laboratório resultados comparáveis com os proporcionados por estudos em mitocôndrias de fígado de rato (Monteiro et al., 2008a; Pereira et al., 2009). No anexo III ilustram-se resultados de consumo de oxigénio em protoplastos de *Geobacillus stearothermophilus* e mitocôndrias de fígado de rato na presença do herbicida, linurão, mostrando a similaridade entre as concentrações a que, ocorrem efeitos inibitórios da atividade dos dois sistemas respiratórios (procariótico e eucariótico) e a diferença entre as concentrações a que os herbicidas linurão e alacloro exercem esses efeitos no sistema respiratório mitocondrial (sendo as concentrações inibitórias de alacloro uma ordem de grandeza superior às de linurão).

Os efeitos dos fulerenos na atividade respiratória de *G. stearothermophilus*, avaliados em protoplastos da bactéria e utilizando NADH como substrato respiratório, estão ilustrados na Fig. 19. Em todas as experiências, a adição de KCN (1 mM), um inibidor conhecido da citocromo-oxidase, aboliu completamente o consumo de oxigénio pelos protoplastos, promovido por NADH. Desta forma, ficou comprovado que a oxidação de NADH, nas condições experimentais utilizadas, ocorreu ao nível da cadeia de transporte de eletrões conducente à redução de oxigénio.

As nanopartículas de C₆₀ na gama de concentrações utilizada (10 a 200 µg/mg de proteína) não perturbaram a respiração de *G. stearothermophilus*. As nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ promoveram, porém, um decréscimo significativo da velocidade de consumo de oxigénio dos protoplastos, embora só a concentrações superiores a 1040 µg/mg de proteína (Fig. 19). Atendendo a que os ensaios de consumo de oxigénio foram realizados em 1 ml de meio de reação com uma quantidade de protoplastos correspondente a 0,1 mg de proteína (cf. descrito na secção de Material e Métodos), a concentração mencionada de 1040 µg de nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ por mg de proteína, corresponde a uma suspensão de 104 mg de nanopartículas por L de meio de reação. Ora, a esta concentração, as nanopartículas do fulereno hidroxilado não promoveram alterações no crescimento da bactéria (Fig. 17).

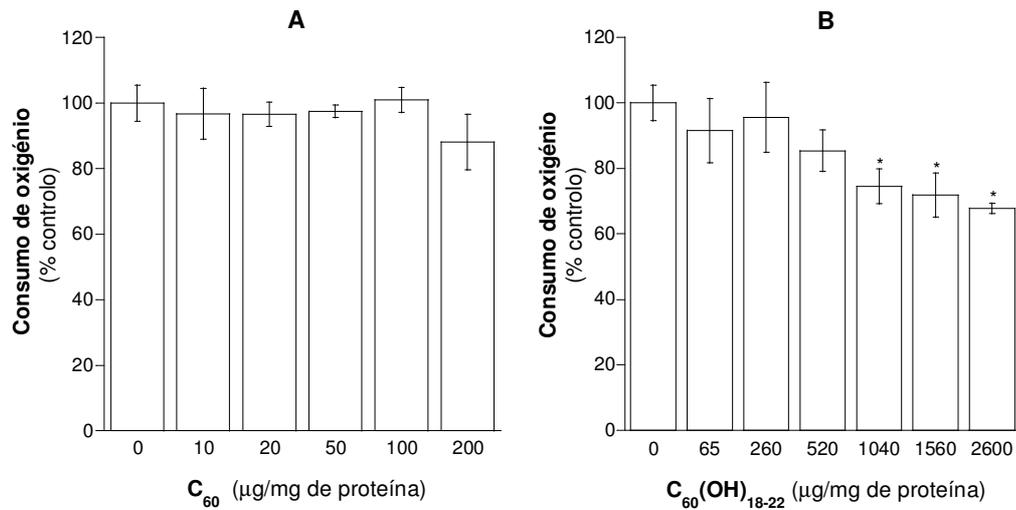


Figura 19 – Efeito de concentração de nanopartículas de C_{60} (A) e $C_{60}(OH)_{18-22}$ (B) na velocidade de consumo de oxigénio por protoplastos de *G. stearothermophilus* na presença de NADH como substrato respiratório (5 mM). Na ausência de fulerenos (controlo) registou-se uma velocidade de consumo de oxigénio de $233,8 \pm 12,8$ nmol O_2 /min/mg de proteína. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo e são a média \pm desvio-padrão de 3 ensaios independentes. Os valores na presença de fulerenos foram comparados com os valores do controlo (ausência de fulerenos) utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. (* $p < 0,05$)

Face ao exposto, algumas conclusões podem ser tiradas. Em primeiro lugar, no que diz respeito às nanopartículas de C_{60} , a ausência de efeitos na atividade respiratória de *G. stearothermophilus* é perfeitamente compatível com a sua muito ténue ação ao nível do crescimento da bactéria (verificando-se apenas uma queda de 6% no rendimento celular em fase estacionária das culturas) e, por outro lado, parece afastar a hipótese de a parede celular constituir um impedimento ao acesso das nanopartículas aos complexos enzimáticos que fazem o suporte de vida das células. No que se refere às nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$, atendendo a que o crescimento da bactéria não foi em absoluto afetado por aquelas nanopartículas até concentrações de 200 mg/L, foi de alguma forma surpreendente ter observado uma inibição significativa do consumo de oxigénio nos protoplastos, a partir de concentrações no meio de reação inferiores àquela concentração (104 mg/L). Podemos interpretar tais resultados de duas formas: por um lado, a parede celular da bactéria, com a sua rede de ligações glicosídicas, poderia aprisionar mais eficazmente as nanopartículas de fulereno hidroxilado do que as do fulereno sem grupos OH; por outro lado, *G.*

stearothermophilus dispõe de alternativas metabólicas que poderão assegurar a viabilidade da célula apesar de ter ocorrido alguma inibição a determinado nível do seu sistema de fosforilação oxidativa (ver Capítulo 4, Discussão).

3.2.3 Avaliação da toxicidade das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ numa planta aquática (*Lemna gibba*)

Tendo sido observada uma toxicidade diminuta dos fulerenos no microrganismo procariótico aeróbio que utilizámos como modelo, quisemos, na parte que se segue do trabalho, investigar os efeitos daqueles compostos num organismo eucariótico fotossintético. Considerando que, desta forma, ambos os organismos–modelo dependeriam de oxigénio, a hipótese formulada que se pretendeu testar prende-se com a possibilidade de o metabolismo dependente da luz no organismo fotossintético o tornar mais suscetível à toxicidade exercida pelos fulerenos. Desta forma, a planta aquática fotossintética *Lemna gibba* surgiu como um modelo adequado a estes estudos, pela facilidade com que pode ser obtido e mantido em laboratório, para além de constituir um exemplo de um organismo produtor primário no ambiente em que habita, suscetível de ser contaminado por águas residuais de produtos industriais ou domésticos contendo fulerenos.

3.2.3.1 Efeito das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ no crescimento e no conteúdo em clorofilas de *Lemna gibba*

Com o objetivo de avaliar os potenciais efeitos dos fulerenos na proliferação vegetativa da planta aquática de água doce *Lemna gibba*, transferiu-se igual número de plantas para aquários contendo meio Hutner, sem nanopartículas (controlo) ou com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de C₆₀ (1 a 10 mg/L) ou de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (20 a 100 mg/L). Ao fim de sete dias de exposição aos fulerenos, as plantas foram contadas nos três aquários e as clorofilas (clorofila *a* e clorofila *b*) extraídas e quantificadas.

A Fig. 20 mostra o efeito de concentrações crescentes de fulerenos na taxa de crescimento de *Lemna gibba* ao fim de 7 dias de exposição, estimada com base no número

de plantas resultantes da proliferação vegetativa. Enquanto o aumento da concentração de nanopartículas de C_{60} promoveu uma diminuição progressiva da taxa relativa de crescimento de *Lemna gibba*, tendo-se registado um decréscimo máximo (de 25%) à concentração de 10 mg de C_{60} /L (Fig. 20A), o aumento da concentração de nanopartículas de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ (até 100 mg/L) não teve nenhum impacto significativo no crescimento da planta (Fig. 20C).

Uma vez que *Lemna gibba* é uma planta fotossintética e o estado funcional dos cloroplastos depende em grande medida do conteúdo em clorofilas e das proporções relativas entre os dois tipos de clorofilas *a* e *b*, estas foram extraídas e quantificadas no final do período de exposição aos fulerenos. Desta forma, pretendeu-se correlacionar a ação das nanopartículas na proliferação vegetativa com os seus efeitos na composição em clorofilas da referida planta. Tanto as nanopartículas de C_{60} como as de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ promoveram um decréscimo da quantidade das clorofilas *a* e *b*, embora, para a mesma gama de concentrações (< 20 mg/L), as nanopartículas de C_{60} (Fig. 20B) tenham conduzido a um decréscimo muito mais pronunciado do que o induzido pelas nanopartículas do fulereno hidroxilado (Fig. 20D). Por outro lado, a dependência da concentração desse efeito foi também distinta para os dois tipos de nanopartículas. Assim, no caso de C_{60} , o efeito máximo foi observado à concentração de 2 mg/L, à qual os conteúdos de clorofila *a* e clorofila *b* diminuíram 30% e 60%, respetivamente. A partir desta concentração, o aumento da mesma até ao valor máximo ensaiado (10 mg/L) não produziu qualquer efeito adicional. Pelo contrário, o aumento da concentração das nanopartículas de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$ promoveu uma diminuição progressiva do conteúdo em clorofilas (clorofila *a* e clorofila *b*), tendo sido atingindo o efeito máximo apenas à concentração de 100 mg/L, à qual o conteúdo de clorofila *a* diminuiu 22% e o de clorofila *b*, 34%.

É de realçar que ambos os tipos de nanopartículas conduziram a um decréscimo da clorofila *b* superior ao da clorofila *a*, correspondendo o primeiro decréscimo ao dobro do segundo, no caso de C_{60} , e sendo 1,5 vezes maior, no caso de $C_{60}(\text{OH})_{18-22}$. Este efeito pode ter conduzido a razões anómalas entre as clorofilas *a* e *b*, com eventual prejuízo na organização estrutural da antena coletora de luz do fotossistema II perturbando, assim, a fotossíntese (Dewez et al., 2003).

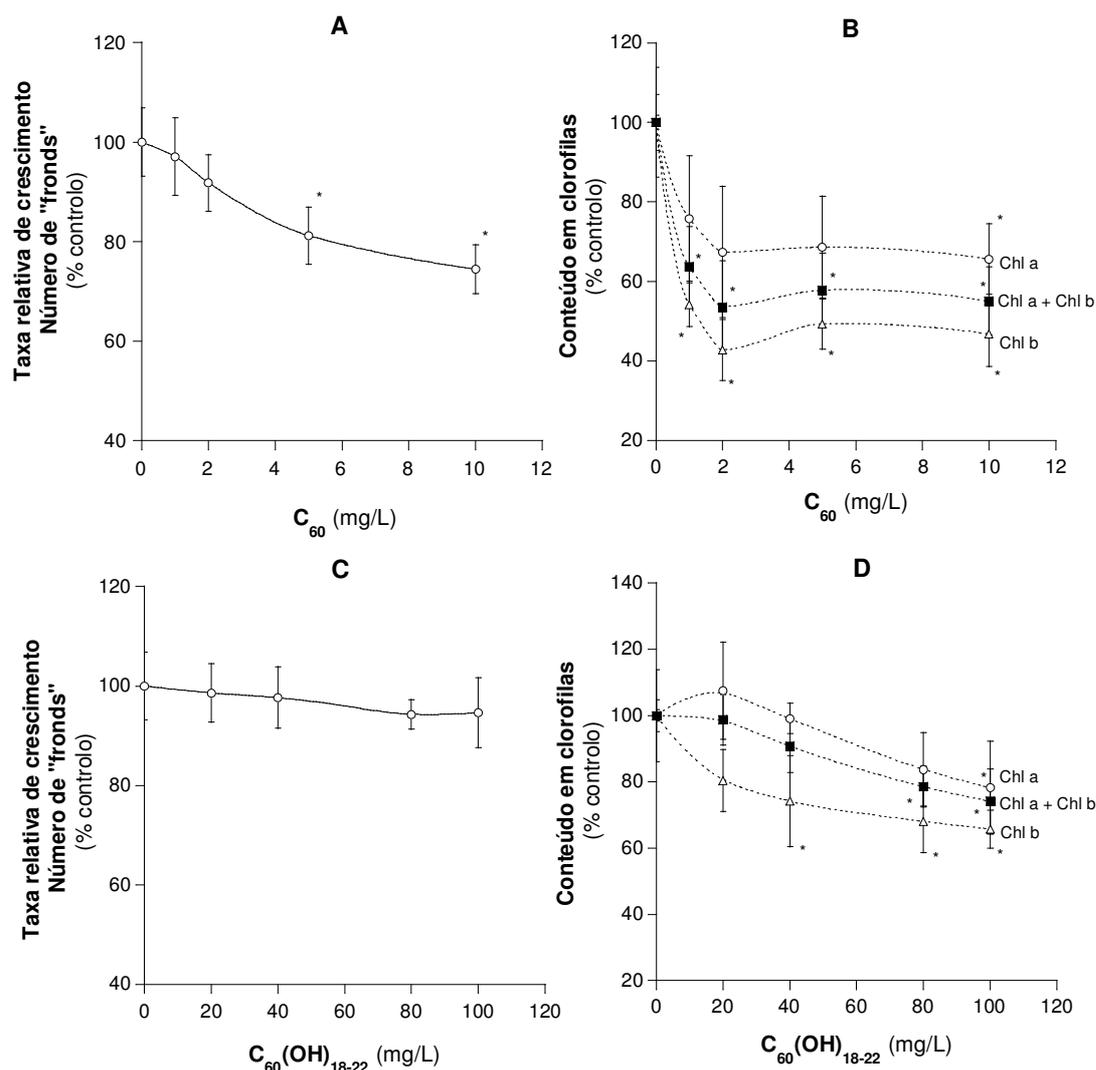


Figura 20 – Efeito da concentração de nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ na taxa relativa de crescimento (A, C) e no conteúdo em clorofilas (B, D) da *Lemna gibba* após 7 dias de incubação com C₆₀ (A, B) ou com C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (C, D). A taxa relativa de crescimento foi calculada de acordo com a fórmula matemática descrita na seção de Materiais e Métodos. Todos os valores experimentais estão expressos em percentagem do controle (*Lemna gibba* desenvolvida na ausência de fulerenos) e são a média ± desvio-padrão de 3 ensaios independentes. Os valores na presença dos fulerenos foram comparados com os valores do controle (ausência de fulerenos) utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. (*p < 0,05)

3.2.3.2 Efeito das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ na atividade fotossintética de *Lemna gibba*

A observação de que ambos os fulerenos tinham um efeito marcado na composição em clorofilas de *Lemna gibba* muito embora só as nanopartículas de C_{60} tivessem afetado a proliferação vegetativa da planta, tornou premente realizar estudos da atividade fotossintética da planta, na presença dos dois tipos de partículas. Para esse efeito, foram conduzidos ensaios *in vitro* com cloroplastos isolados e a taxa de produção de oxigênio foi medida na presença de concentrações crescentes das nanopartículas de C_{60} (1 a 15 mg/L) e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (20 a 100 mg/L), conforme documentado na Fig. 21. Enquanto as nanopartículas de C_{60} (até à concentração de 15 mg/L) promoveram uma diminuição progressiva da taxa de produção de oxigênio (Fig. 21A), as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (até à concentração de 100 mg/L) não afetaram a atividade dos cloroplastos da *Lemna gibba* (Fig. 21B).

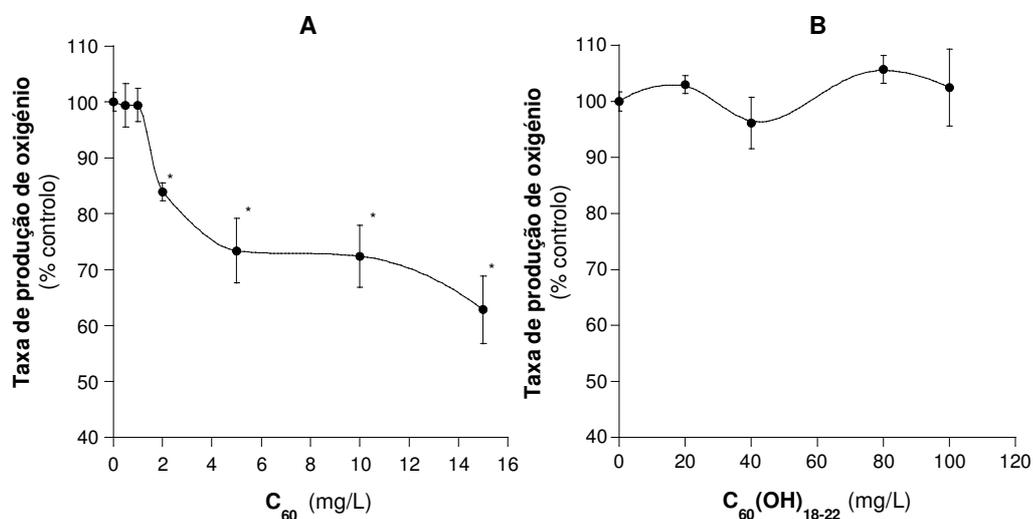


Figura 21 – Efeito de concentração de nanopartículas de C_{60} (A) e $C_{60}(OH)_{18-22}$ (B) na taxa de produção de oxigênio de cloroplastos isolados de *Lemna gibba*. Na ausência de fulerenos (controle), foi obtida uma taxa de produção de oxigênio de $77,3 \pm 1,3 \mu\text{mol O}_2/\text{mg}$ de clorofila total/h. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controle e são a média \pm desvio-padrão de 3 ensaios independentes. Os valores na presença de fulerenos foram comparados com os valores do controle (ausência de fulerenos) utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. (* $p < 0,05$)

Integrando estes resultados com os relativos aos conteúdos de clorofilas, há dois aspetos que se salientam. Em primeiro lugar, os efeitos das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ na composição em clorofilas de *Lemna gibba* não se repercutiram no funcionamento dos cloroplastos. Em segundo lugar, a inibição promovida por C_{60} na produção de oxigénio pelos cloroplastos foi progressivamente aumentando com a concentração das nanopartículas até 15 mg/L, enquanto o efeito máximo no conteúdo de clorofilas foi observado com 2 mg de nanopartículas de C_{60} /L. É, no entanto, interessante notar que a atividade fotossintética decaiu mais abruptamente na gama de concentrações de C_{60} até 2 a 3 mg/L e depois mais suavemente para concentrações maiores de fulereno, denotando alguma relação (mas não exclusiva) com o conteúdo de clorofilas.

Assim, da primeira observação, relativa a $C_{60}(OH)_{18-22}$, podemos concluir que a atividade fotossintética de *Lemna gibba* pode suportar algumas oscilações no conteúdo de clorofilas, o que justificaria, por sua vez, não ter sido afetado o desenvolvimento da planta na presença de nanopartículas daquele fulereno. Em relação a C_{60} , os resultados mencionados sugerem que outros efeitos, para além das alterações na composição em clorofilas de *Lemna gibba*, deverão ter estado na base da inibição promovida por aquelas nanopartículas na fotossíntese (na gama de concentrações de 2 a 15 mg/L) e consequentemente no crescimento (até concentrações de 10 mg/L). Os perfis de alteração da taxa relativa de crescimento e da taxa de produção de oxigénio pelos cloroplastos, em função da concentração de nanopartículas, apresentaram, para ambos os fulerenos, C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$, um notável paralelismo, sugerindo uma relação mecanística entre o crescimento de *Lemna gibba* e a atividade de fotossíntese dos cloroplastos. No caso específico de C_{60} , a toxicidade *in vivo*, patente na diminuição do crescimento da *Lemna gibba*, pode ter resultado da diminuição da funcionalidade dos cloroplastos devido a efeitos adicionais ao decréscimo das clorofilas *a* e *b* e ao estabelecimento de uma relação anómala entre as duas clorofilas causadora de danos na antena coletora de luz do fotossistema II, designadamente: uma interação direta das nanopartículas de C_{60} com o fotossistema II (perturbando a reação de Hill) ou distúrbios causados na transferência de eletrões entre os complexos da cadeia transportadora de eletrões. Neste contexto, um processo oxidativo associado à produção de espécies reativas de oxigénio pode ter contribuído para a disfunção do fotossistema II.

Efetivamente, estudos em diversos sistemas biológicos têm demonstrado que as nanopartículas de C_{60} são capazes de promover toxicidade relacionada com um desequilíbrio óxido-redutivo da célula (Oberdörster, 2004; Sayes et al., 2005; Usenko et

al., 2008). Como já foi referido na Introdução (Capítulo 1), as moléculas de C₆₀ absorvem na região do visível e UV do espectro da luz e, na presença de oxigénio molecular, podem dar origem a espécies reativas de oxigénio (ROS), particularmente oxigénio singlete e anião superóxido (Guldi e Asmus, 1999; Pickering e Wiesner, 2005; Hotze et al., 2008; Brunet et al., 2009).

Em suma, os resultados do estudo a que se reporta o presente capítulo são comprovativos da importância da luz para a toxicidade de C₆₀, uma vez que o organismo dependente da luz para a sua sobrevivência (*Lemna gibba*) foi afetado pela presença de C₆₀, ao contrário do microrganismo que, embora igualmente aeróbio, se desenvolveu em condições de baixa luminosidade (interior de incubadora com banho de água).

3.3 Interação das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ com células animais: da citotoxicidade às suas potenciais aplicações farmacológicas

As dimensões nanométricas dos fulerenos conferem-lhes propriedades físico-químicas únicas, que têm vindo a ser exploradas no desenvolvimento de dispositivos terapêuticos ou de diagnóstico (Tóth et al., 2004; Mroz et al., 2007; Yin et al., 2008; Yang et al., 2010).

Neste contexto, pretendeu-se nesta fase do trabalho avaliar o potencial terapêutico das nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, tendo em conta as propriedades manifestadas relativamente à partilha em membranas nativas e à baixa atividade toxicológica numa diversidade de sistemas biológicos (resultados anteriores). Com este objetivo em mente, foi traçado um plano de trabalho que consistiu em três etapas fundamentais. Em primeiro lugar, foi determinada a toxicidade das referidas nanopartículas em vários tipos de células animais; em seguida, foram avaliados os efeitos protetores dos fulerenos no stresse oxidativo induzido por um agente oxidante e lesivo da função mitocondrial, o *t*-butil-hidroperóxido, tanto em células animais como ao nível das membranas de mitocôndrias isoladas de tecido animal. Por último, foi investigada a aplicabilidade das nanopartículas como vetores de ácidos nucleicos em células animais. Dada a elevada suscetibilidade das células neuronais ao stresse oxidativo, os ensaios de citotoxicidade e de proteção das células a agentes oxidantes foram conduzidos em células neuro2a, uma linha celular de neuroblastoma de rato. A citotoxicidade das nanopartículas foi ainda estudada em células HeLa (de carcinoma do colo do útero humano), comumente utilizadas como um modelo toxicológico humano, e em astrócitos de rato (oferecendo estes a vantagem de constituírem uma cultura primária de células neuronais). Em relação às experiências de vectorização de ácidos nucleicos, os modelos celulares escolhidos foram, no caso de plasmídeo de DNA, as células HeLa, por serem em norma facilmente transfectáveis, e, no caso de moléculas de siRNA, células HT-1080 e células U87, por existirem no nosso laboratório essas linhas modificadas de forma a expressarem a proteína GFP, o que facilita a deteção de silenciamento por citometria de fluxo (refletindo-se em decréscimo de fluorescência). Acresce ainda como vantagem no contexto deste estudo que as últimas células são também de origem nervosa.

Como agente oxidante, o *t*-butil-hidroperóxido foi escolhido neste trabalho por se tratar de um composto cuja toxicidade conducente a morte celular por apoptose, mediada

pela via intrínseca mitocondrial, parece estar mecanisticamente relacionada com a indução de stresse oxidativo (Cai et al., 1999; Sardão et al., 2007).

3.3.1 Propriedades físico-químicas e citotoxicidade das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂

No sentido de avaliar a influência das características físico-químicas dos fulerenos na sua atividade biológica em células animais, foram realizados estudos de toxicidade das nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ utilizando duas linhas celulares imortalizadas (HeLa e neuro2a) e uma cultura primária (astrócitos de rato). Previamente, as dimensões e o potencial Zeta das nanopartículas foram determinadas no meio de cultura das células (DMEM), às concentrações máximas utilizadas nos ensaios com este material biológico. Conforme consta da Tabela V, o potencial Zeta das nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ em suspensão em água não sofreu alteração após diluição das respetivas suspensões aquosas concentradas em DMEM. Em relação às dimensões das nanopartículas, a alteração mais notória foi observada com o fulereno C₆₀, tendo ocorrido um decréscimo de cerca de 30% do tamanho das nanopartículas, após transferência para DMEM.

Tabela V – Dimensões e potencial Zeta das nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ em suspensão em água e no meio de cultura das células.

Meio aquoso	C ₆₀		C ₆₀ (OH) ₁₈₋₂₂	
	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)
Água	31,5 ± 4,0	- 24,0 ± 3,5	2,3 ± 0,3	- 36,5 ± 4,3
DMEM	22,2 ± 1,8	- 24,5 ± 2,3	2,0 ± 0,2	- 33,1 ± 3,7

Com o objetivo de determinar os efeitos citotóxicos dos fulerenos, as células foram incubadas com as nanopartículas a diferentes concentrações (5 a 15 mg/L para C_{60} e 5 a 100 mg/L para $C_{60}(OH)_{18-22}$) durante 48 horas, tendo sido a sua viabilidade avaliada às 24 h e no final da incubação (48 h), pelo método do Alamar blue (Ansar Ahmed et al., 1994) com algumas alterações (Cardoso et al., 2011). Esta metodologia de avaliar a citotoxicidade de compostos alia à rapidez e à simplicidade de execução a vantagem de não interferir com o crescimento das células em cultura, permitindo a monitorização contínua da sua viabilidade ao longo do tempo de incubação com os compostos a analisar.

A Fig. 22 mostra o efeito de concentrações crescentes de nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ na viabilidade de células HeLa, neuro2a e astrócitos de rato, que foram selecionadas para estes ensaios pelas razões previamente apresentadas. Os fulerenos mostraram não causar perturbação significativa da viabilidade destas células quando expostas às nanopartículas por períodos de 24 e 48 horas.

Os dados existentes na literatura relativos à toxicidade de fulerenos em culturas de células animais mostram grande variabilidade. Assim, no que respeita a C_{60} , podem ser encontrados resultados muito semelhantes aos referidos neste trabalho (por exemplo, reportando ausência de toxicidade das nanopartículas de C_{60} até concentrações de 10 mg/L em macrófagos humanos, após 48 h de exposição; (Porter et al., 2006)), a par de outros que apontam para a toxicidade dessas nanopartículas em fibroblastos de derme humana e células de hepatocarcinoma humano (HepG2), toxicidade que seria manifestada pelas nanopartículas de $C_{60}(OH)_{24}$ nas mesmas células apenas a concentrações 7 ordens de grandeza superiores às de C_{60} (Sayes et al., 2004). Por outro lado, Su e colaboradores (2010) demonstraram que as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{22-24}$ exercem efeitos distintos em linhas celulares diferentes. A disparidade de resultados com respeito à citotoxicidade dos fulerenos deve-se possivelmente a vários fatores, entre os quais se contam a utilização de diferente material biológico e diferentes condições experimentais. Acrescem ainda, como já referimos atrás, diferenças na preparação das suspensões de nanopartículas, o que no caso de C_{60} assume particular importância. Torna-se, deste modo, premente que sejam levados a cabo estudos sistemáticos da toxicidade dos fulerenos em vários tipos de linhas celulares, acompanhados de uma caracterização das nanopartículas nos respetivos meios experimentais, para que se possa progredir no conhecimento da interação destes nanomateriais com os sistemas biológicos.

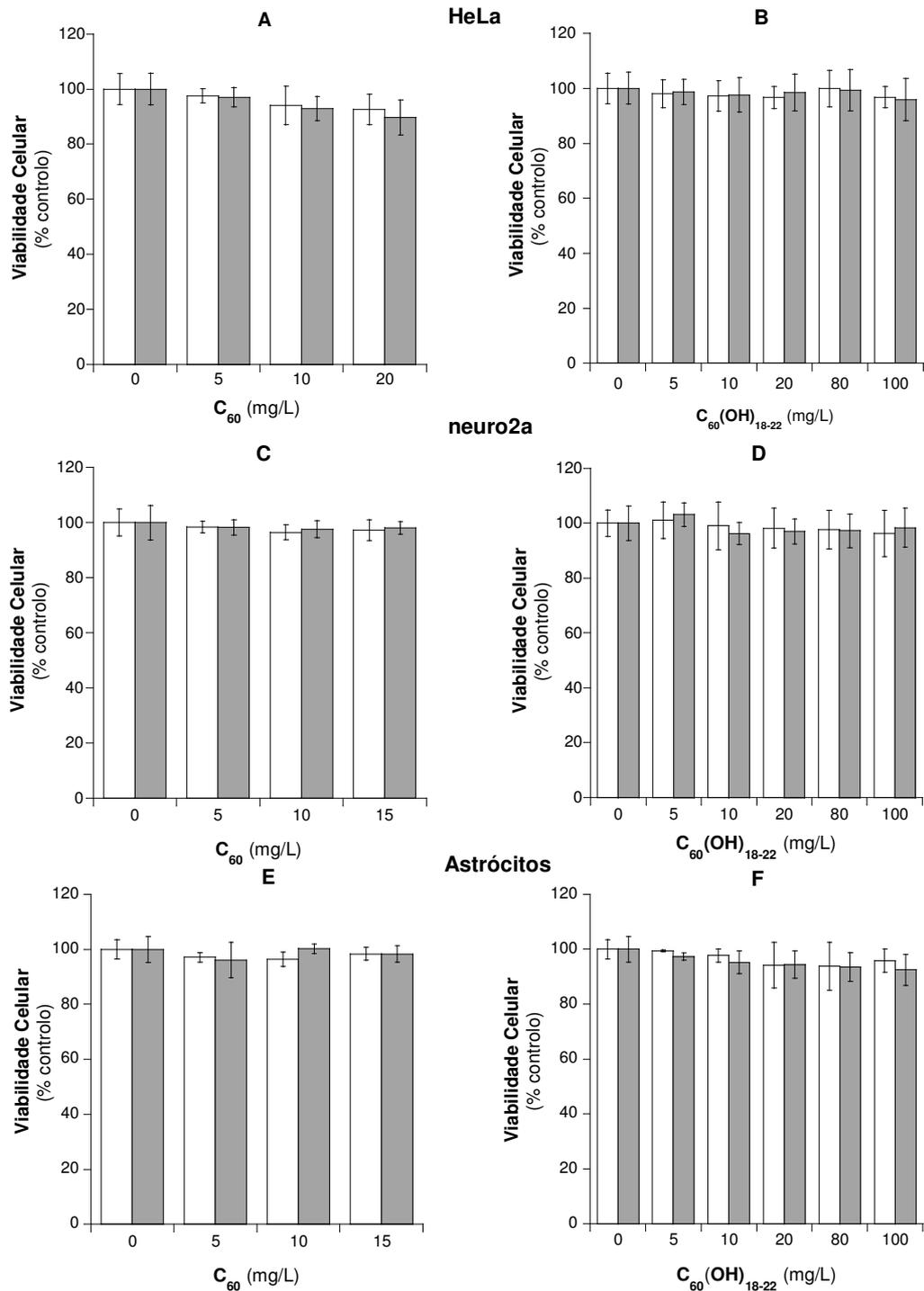


Figura 22 – Efeito de concentração de nanopartículas de C₆₀ (A, C e E) e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (B, D e F) na viabilidade de células HeLa (A e B), de células neuro2a (C e D) e de astrócitos de rato (E e F) após 24 (barras brancas) e 48 horas (barras cinzas) de incubação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do Alamar Blue com algumas modificações, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controle (células cultivadas na ausência de fulerenos) e correspondem à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes.

3.3.2 Atividade antioxidante das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂

Em virtude das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ não terem afetado a proliferação de vários tipos de células, incluindo as de origem nervosa, consolidou-se a hipótese de estes materiais nano-estruturados poderem ser utilizados em intervenções terapêuticas. Uma vez que o stresse oxidativo é um mecanismo envolvido em várias situações patológicas, incluindo doenças neurodegenerativas (Reynolds et al., 2007), e dada a reconhecida capacidade dos fulerenos para captarem eletrões, o passo seguinte neste trabalho consistiu em avaliar *in vitro* o potencial das nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ em se oporem à ação de agentes pro-oxidantes conhecidos.

O *t*-butil-hidroperóxido foi o agente oxidante escolhido pelas razões previamente evocadas. Este composto tem sido muito usado em estudos em que se pretende impor um stresse oxidativo às células e testar a eficiência de moléculas capazes de prevenir ou remediar a ação deletéria de fatores pro-oxidantes. Têm sido reportadas várias alterações fisiológicas em células expostas a *t*-butil-hidroperóxido, em consequência de distúrbios no seu equilíbrio óxido-redutor, conducentes à morte por apoptose ou necrose, dependendo da linha celular, da concentração e do tempo de exposição (Sardão et al., 2007). Assim, numa primeira etapa, encetaram-se ensaios a fim de determinar a concentração de *t*-butil-hidroperóxido capaz de diminuir em aproximadamente 50% a proliferação das células neuro2a. Para esse efeito, as células foram incubadas com *t*-butil-hidroperóxido a diferentes concentrações (0 a 75 µM) durante um período de 24 horas, após o que se determinou, para cada concentração ensaiada, a massa celular existente na cultura em termos do seu conteúdo proteico, através de um método espectrofotométrico que utiliza a sonda sulforodamina B. Esta metodologia permitiu avaliar a proliferação das células e tem a vantagem, relativamente ao método do Alamar blue, de não depender para essa avaliação do estado redox da célula, com o qual o indutor de stresse oxidativo poderia interferir. A Fig. 23 mostra os efeitos de concentrações crescentes de *t*-butil-hidroperóxido no conteúdo proteico das células neuro2a ao fim de 24 horas de incubação.

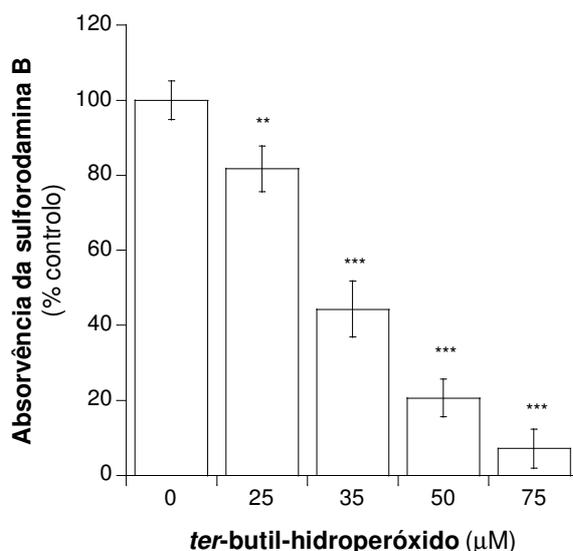


Figura 23 – Efeito de concentração de *t*-butil-hidroperóxido na proliferação de células neuro2a. A proliferação celular foi avaliada em termos do conteúdo proteico celular existente ao fim de 24 horas de incubação com o composto pro-oxidante, medindo a absorvência da sulforodamina B, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (cultura celular na ausência de *t*-butil-hidroperóxido) e correspondem à média \pm desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes. Os valores na presença de *t*-butil-hidroperóxido foram comparados com o controlo utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A construção de uma curva de calibração permitiu determinar a concentração de *t*-butil-hidroperóxido para a qual a proliferação celular sofreu uma redução aproximada de 50% após um período de incubação com o composto de 24 horas. Essa concentração tomou o valor de 35 μM e foi selecionada para ensaiar o efeito antioxidante das nanopartículas de fulereno nas células neuro2a. Deste modo, as células neuro2a foram incubadas com *t*-butil-hidroperóxido na concentração de 35 μM e com as nanopartículas a diferentes concentrações (1 a 5 mg/L para C_{60} e 5 a 20 mg/L para $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18-22}$), durante um período de 24 h. A este procedimento deu-se a designação de Procedimento A. Alternativamente, procedeu-se à pré-incubação das células neuro2a com os fulerenos, durante duas horas, e adicionou-se o *t*-butil-hidroperóxido (35 μM) após remoção dos fulerenos do meio de cultura das células, as quais foram incubadas com o oxidante durante 24 h (Procedimento B). Em ambos os casos, a viabilidade das células foi avaliada por

determinação do seu conteúdo proteico através da medição da absorvência da sulforodamina B (ver secção de Materiais e Métodos).

Em paralelo, decorreram ensaios, utilizando os dois procedimentos (A e B), em que os fulerenos foram substituídos por trolox (um conhecido agente antioxidante) como controlo positivo. Este antioxidante, derivado da vitamina E e solúvel em água devido à remoção da cadeia fitil (Albertini e Abuja, 1999), tinha mostrado a capacidade de prevenir os efeitos citotóxicos promovidos por *t*-butil-hidroperóxido em estudos efetuados por outros autores com células H9c2, provenientes de tecido de coração de ratos na fase embrionária (Sardão et al., 2007).

As nanopartículas de C₆₀ mostraram ser capazes de proteger as células neuro2a dos efeitos causados pelo *t*-butil-hidroperóxido (Fig. 24), revertendo parcialmente o decréscimo do conteúdo proteico (massa celular) das culturas induzido por *t*-butil-hidroperóxido, tanto na situação em que as células foram incubadas simultaneamente com *t*-butil-hidroperóxido e C₆₀ por um período de 24 h (Procedimento A, Fig. 24A) como no caso em que as células foram pré-incubadas com as nanopartículas de C₆₀ durante 2 h e, a seguir, expostas 24 h ao oxidante (Procedimento B, Fig. 24B). O efeito de reversão da ação tóxica de *t*-butil-hidroperóxido mostrou ser dependente da concentração de nanopartículas de C₆₀, tendo aumentado com o aumento da concentração de C₆₀. É interessante notar, porém, que mesmo a concentração máxima de C₆₀ ensaiada nestas experiências (5 mg/L, a que corresponde uma concentração de 6,9 µM) é mais de 5x inferior à do agente oxidante (*t*-butil-hidroperóxido 35 µM), o que sugere que uma molécula de C₆₀ tem capacidade para neutralizar mais do que um radical *t*-butoxi, vindo ao encontro do conceito propalado na literatura de que C₆₀ é uma “esponja de radicais” (Krusic et al., 1991). Repare-se que os efeitos promovidos pelas nanopartículas de C₆₀ à concentração de 6,9 µM foram claramente superiores aos obtidos com trolox a uma concentração (100 µM) 15 x maior. É também de realçar que, ao invés de C₆₀, trolox só foi significativamente eficaz a reverter o efeito deletério de *t*-butil-hidroperóxido quando se utilizou o procedimento A, em que as células foram expostas concomitantemente a oxidante e antioxidante. No caso de C₆₀, o efeito protetor foi observado independentemente da sequência de adição do oxidante e do fulereno, embora apenas no caso em que houve adição simultânea dos dois compostos tenha sido exercido efeito significativo para as mais baixas concentrações de C₆₀ (1 e 2,5 mg/L). Se, por um lado, a ação antioxidante de C₆₀ exercida em concomitância com a atuação do agente oxidante (Procedimento A) se adequa a um efeito anti-radicalar, a ação de C₆₀ antecedendo a de *t*-butil-hidroperóxido (Procedimento B) parece, por outro lado,

poder prender-se tanto com uma atividade anti-radical (efeito direto) como com uma estimulação das defesas antioxidantes da célula (efeito indireto). Este aspeto está presentemente em investigação.

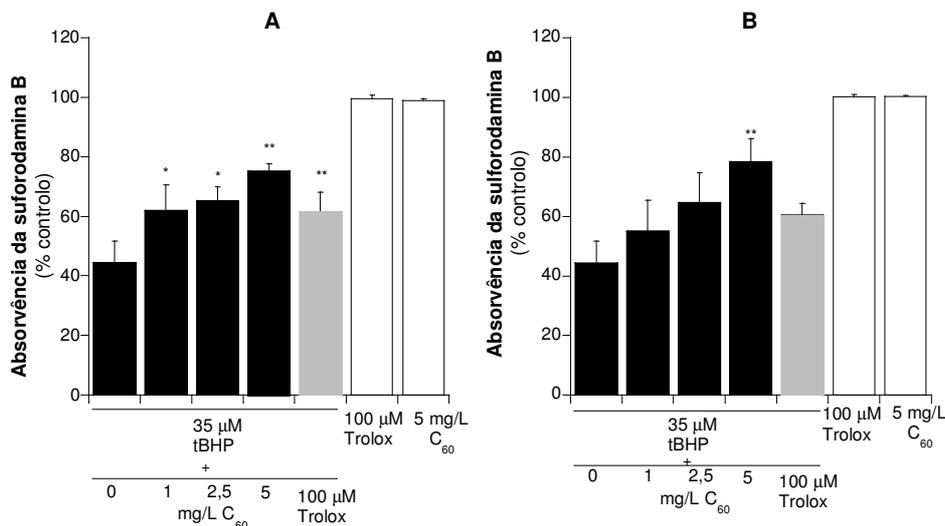


Figura 24 – Efeito do *t*-butil-hidroperóxido (tBHP) na proliferação de células neuro2a, nas seguintes condições: (A) incubação com tBHP (35 µM), durante 24 h, na ausência ou na presença de concentrações crescentes de nanopartículas de C₆₀ (barras a preto) ou de 100 µM de trolox (barra cinzenta), de acordo com o Procedimento A, ou (B) incubação das células, durante 24 h, com tBHP (35 µM), antecedida de pré-incubação de 2 h com concentrações crescentes de nanopartículas de C₆₀ (barras a preto) ou com 100 µM de trolox (barra cinzenta), de acordo com o Procedimento B. O efeito da adição de trolox (100 µM) e de C₆₀ (5 mg/L) na ausência de composto indutor de stresse oxidativo (tBHP) foi igualmente testado (barras a branco). A proliferação celular foi avaliada por determinação do conteúdo proteico celular existente no final das 24 horas de incubação com tBHP, medindo a absorvência da sulforodamina B, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células cultivadas na ausência de tBHP e de nanopartículas) e correspondem à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes. Os valores obtidos na presença de fulereno ou de trolox foram comparados com os valores obtidos na presença de tBHP 35 µM e na ausência de outros aditivos, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p<0,05 e **p<0,01.

No que diz respeito às nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ (Fig. 25), estas revelaram-se incapazes de proteger as células neuro2a dos efeitos tóxicos promovidos pelo *t*-butil-hidroperóxido, em ambas as situações experimentais: incubação das células com o *t*-butil-hidroperóxido e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ durante 24 h (Procedimento A; Fig. 25A) ou incubação das células com o *t*-butil-hidroperóxido durante 24 h, precedida de uma pré-incubação com as nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ durante 2 h (Procedimento B; Fig. 25B). Estes resultados

mostraram que a química superficial das nanopartículas de fulereno é determinante da capacidade de proteção das células contra danos causados por agentes oxidantes. Atendendo a que o potencial redutor dos fulerenos reside nas duplas ligações de carbono, é previsível que a presença de 18 a 22 substituintes OH no caso do fulereno hidroxilado $C_{60}(OH)_{18-22}$ reduza substancialmente a sua capacidade de supressão de radicais em relação a C_{60} . No entanto, como foi demonstrado por Wang *et al.* (1999), o potencial antioxidante dos fulerenos não depende estritamente do número de locais reativos. Assim, particularmente quando a peroxidação lipídica é um dos fatores primordiais de dano causado pelo agente oxidante na célula (como é o caso de *t*-butil-hidroperóxido), a localização dos antioxidantes na bicamada lipídica e a forma como interagem com a membrana são determinantes do grau de proteção que conferem à célula.

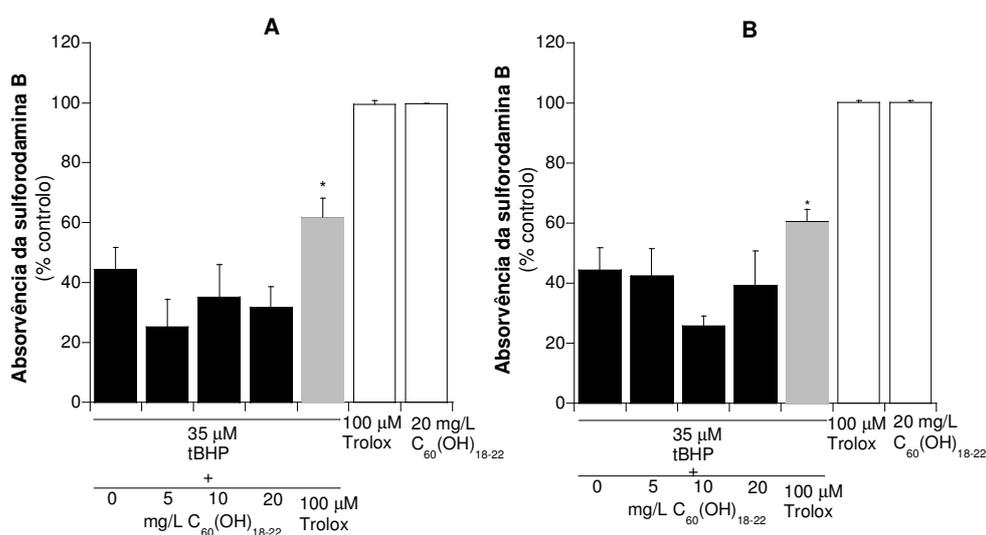


Figura 25 – Efeitos do *t*-butil-hidroperóxido (tBHP) na proliferação de células neuro2a, nas seguintes condições: (A) incubação, durante 24 h, com tBHP (35 μM) na ausência ou na presença de concentrações crescentes de nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (barras a preto) ou de 100 μM de trolox (barra cinzenta), de acordo com o Procedimento A, ou (B) incubação das células, durante 24 h, com tBHP (35 μM), antecedida de pré-incubação de 2 h com concentrações crescentes de nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ (barras a preto) ou com 100 μM de trolox (barra cinzenta), de acordo com o Procedimento B. O efeito da adição de trolox (100 μM) e $C_{60}(OH)_{18-22}$ (20 mg/L) na ausência de composto indutor de stresse oxidativo (tBHP) foi igualmente testado (barras a branco). A proliferação celular foi avaliada por determinação do conteúdo proteico da massa celular existente no final das 24 horas de incubação com tBHP, medindo a absorvência da sulforodamina B, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células cultivadas na ausência de tBHP e de nanopartículas), e correspondem à média \pm desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes. Os valores obtidos na presença de fulereno ou de trolox foram comparados com os valores obtidos na presença de tBHP 35 μM e na ausência de outros aditivos, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. * $p < 0,05$.

Uma vez que o *t*-butil-hidroperóxido é conhecido por induzir peroxidação lipídica (Wang et al., 1999) e exercer efeitos deletérios ao nível da mitocôndria (Sardão et al., 2007) conducentes a apoptose (Kim et al., 1998), pretendeu-se saber se a proteção conferida pelas nanopartículas de C₆₀ às células (contrariando a morte celular induzida por *t*-butil-hidroperóxido) seria acompanhada por uma oposição aos efeitos oxidativos daquele agente oxidante em suspensões membranares de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Para esse efeito, a oxidação lipídica das membranas mitocondriais induzida por *t*-butil-hidroperóxido foi monitorizada com o ácido 9,11,13,15-octadecatetraenóico (cis-parinárico). Este último composto apresenta quatro ligações duplas conjugadas que lhe conferem fluorescência quando incorporado nas membranas e, ao mesmo tempo, o tornam um alvo propício à oxidação. Deste modo, a diminuição da intensidade de fluorescência do ácido cis-parinárico, em resultado da degradação oxidativa das suas ligações duplas, constitui uma medida indireta da oxidação lipídica. A Fig. 26 mostra os efeitos de concentrações crescentes de nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ na oxidação lipídica de membranas mitocondriais induzida pelo *t*-butil-hidroperóxido.

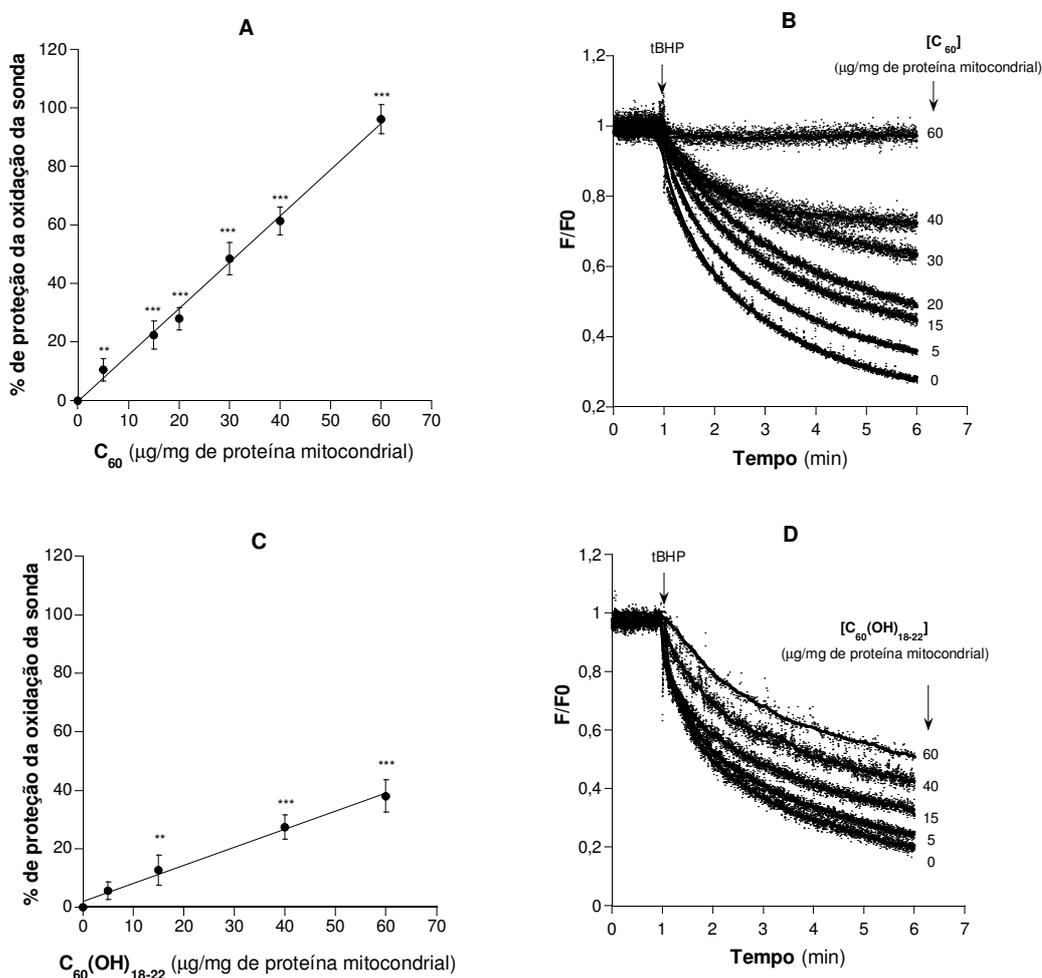


Figura 26 – Efeitos protetores dos fulerenos C_{60} (A, B) e $C_{60}(OH)_{18-22}$ (C, D) na oxidação, induzida por *t*-butil-hidroperóxido (tBHP), do ácido cis-parinário (sonda) incorporado em mitocôndrias. As mitocôndrias (200 μg proteína/ml) foram incubadas com ácido cis-parinário 1,5 μM em meio de reação (KCl 50 mM, Hepes 5 mM, pH 7,2), a 30 °C. A reação de oxidação foi iniciada por adição do tBHP (25 μl a 7,8 M) na ausência (controlo) ou na presença de concentrações crescentes de nanopartículas, com as quais as mitocôndrias foram incubadas 7 minutos, antes da adição do agente oxidante. Em B e D representam-se registos típicos do decréscimo de fluorescência (F), normalizada em relação à fluorescência da sonda na ausência de oxidante e de nanopartículas (F0), ou seja F/F0. O decréscimo de F/F0, i.e. $\Delta(F/F0)$ traduz a extensão da oxidação da sonda induzida por tBHP. $\Delta(F/F0)$ na presença de 77,6 mM de tBHP e na ausência de nanopartículas (curva assinalada com 0 μg de fulereno) ao fim de 6 min de incubação, ou seja $\Delta(F/F0)_{tBHP}$ foi tomado como 100% para o cálculo da % de proteção da oxidação da sonda (representada em ordenada dos gráficos A e C). Assim, $\Delta(F/F0)_x$ foi expresso em % de $\Delta(F/F0)_{tBHP}$, ou seja a % de proteção da oxidação da sonda corresponde a $[\Delta(F/F0)_x / \Delta(F/F0)_{tBHP}] \times 100$. Os valores obtidos na presença de fulereno foram comparados com os valores obtidos na presença de tBHP e na ausência de outros aditivos, utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Ambos os fulerenos protegeram as membranas mitocondriais do efeito oxidativo de *t*-butil-hidroperóxido, mostrando a ação protetora uma dependência da concentração de fulerenos. Contudo, para a mesma concentração (expressa em µg por mg de proteína mitocondrial), o nível de proteção conferido pelas nanopartículas de C₆₀ foi significativamente superior ao exibido pelas nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂. Duas ilações podem ser retiradas destes resultados. Em primeiro lugar, a hipótese de o número de duplas ligações de carbono da estrutura de fulereno poder ser evocada para justificar, só por si, a diferença na ação cito-protetora das nanopartículas de C₆₀ e C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, face aos efeitos oxidativos de *t*-butil-hidroperóxido, não é suportada pelos resultados de peroxidação lipídica em mitocôndrias. Efetivamente, as partículas de fulereno hidroxilado mostraram ser capazes de prevenir a oxidação do ácido cis-parinárico nas membranas mitocondriais. O facto de a gama de concentrações a que esses efeitos foram observados ser superior à do fulereno C₆₀ pode prender-se com a menor partilha das nanopartículas do primeiro fulereno, em relação às do segundo, nas membranas da mitocôndria, como foi demonstrado previamente (secção 3.1). Outro aspeto, a que vários autores têm feito referência como sendo decisivo para a eficiência antioxidante dos fulerenos, diz respeito à sua localização na bicamada lipídica e à sua afinidade pela membrana. De facto, foi demonstrado que tanto o fulereno C₆₀ (lipofílico) como derivados de C₆₀ solúveis em água protegiam os lípidos membranares da peroxidação iniciada por radicais, embora a localização de C₆₀ no interior da membrana lhe conferisse particular capacidade protetora, possivelmente por se encontrar em mais estreita proximidade dos locais em que ocorrem as reações de propagação da peroxidação lipídica (Wang et al., 1999).

3.3.3 As nanopartículas de C₆₀ como vetores de ácidos nucleicos

A baixa toxicidade do fulereno C₆₀, associada ao seu elevado potencial antioxidante, constituiu uma forte motivação para que se aprofundasse a pesquisa de outras aplicações terapêuticas para este material nano-estruturado. Desta forma, investigou-se a possibilidade de utilizar as nanopartículas de fulereno na entrega de ácidos nucleicos a células, assunto relativamente ao qual existe grande controvérsia na literatura. Com a colaboração de um grupo do CNC com larga experiência na formulação de vetores de ácidos nucleicos e na terapia génica (Grupo de Vetores e Terapia Génica), foi encetado um plano de trabalho

com vista a explorar a capacidade dos fulerenos, coadjuvados com outros materiais, formarem sistemas capazes de promover a entrega intracelular de ácidos nucleicos. Dado que as nanopartículas de C_{60} em suspensão aquosa apresentam em relação às nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ uma maior partilha em membranas e uma carga superficial menos negativa (avaliada por determinação do potencial Zeta), escolhemos as primeiras partículas para efetuar os ensaios de entrega de ácidos nucleicos. Por outro lado, como a entrega de pequenos RNA de interferência (siRNA) no citoplasma da célula é, de alguma forma, menos exigente do que a entrega de plasmídeo de DNA ao núcleo, primeiro porque envolve vencer um menor número de barreiras celulares e, em segundo lugar, porque não requer um nível tão elevado de compactação para entrar eficientemente dentro da célula e escapar ao ataque das nucleases celulares, já que as moléculas de siRNA são mais pequenas do que as moléculas de plasmídeo, iniciaram-se estes ensaios com a entrega de siRNAs por formulações contendo C_{60} .

3.3.3.1 Nanopartículas de C_{60} no silenciamento de uma proteína-repórter (GFP) em células animais

Para avaliar a possibilidade de utilização das nanopartículas de C_{60} na formulação de vetores de siRNA, utilizaram-se células HT-1080 (linha celular de fibrossarcoma humano) modificadas de forma a expressarem GFP como proteína-repórter e um siRNA sintético capaz de promover o silenciamento específico daquela proteína (siRNA_{GFP}). Deste modo, foram preparadas suspensões aquosas de DOTAP:DOPE na razão molar de 1:2 contendo nanopartículas de C_{60} nas razões molares C_{60} :lípidos de 1:5, 1:10 e 1:20 (ver secção de Material e Métodos). O lípido DOPE (lípido zwitteriónico e insaturado, com grande propensão para a formação de fases hexagonais invertidas) foi escolhido por ter sido reportado como desempenhando um papel importante na desestabilização da membrana, sendo este efeito particularmente importante ao nível do endossoma para a chamada “fuga” da via endocítica; quanto ao DOTAP, trata-se de um lípido catiónico com grande capacidade de interação com os ácidos nucleicos (Koltover et al., 1998). Os complexos constituídos pela mistura de DOTAP:DOPE ou C_{60} :DOTAP:DOPE e siRNA_{GFP} foram preparados na razão de carga (+/-) de 1/1,5. Esta razão de carga foi escolhida com base em estudos prévios, realizados no nosso laboratório, com outros complexos (misturas

ternárias) que se mostraram eficientes a esta razão de carga no silenciamento da GFP em células HT-1080 (Cardoso et al., 2013). Como controlo negativo, foram preparadas formulações nas mesmas razões molares e de carga, mas contendo um siRNA sintético (siRNA_{mut}) construído de forma a não interferir com a expressão da proteína GFP nem de nenhuma proteína que comprometesse a viabilidade das células HT-1080. Como controlo positivo, foi utilizada a LipofectaminaTM 2000 (um reagente comercial muito utilizado como vetor de ácidos nucleicos) complexada com siRNA_{GFP}.

Como se pode observar na Fig. 27, todos os complexos contendo nanopartículas de C₆₀ na sua composição mostraram maior eficiência do que os lipoplexos constituídos só por lípidos e siRNA_{GFP} no silenciamento de GFP nas células HT-1080. Os complexos que se mostraram mais eficientes foram os que apresentavam uma razão molar C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:5. Nestas condições, a expressão da GFP sofreu um decréscimo de 47,7% (Fig. 27A). Assim, comparativamente com a formulação lipossómica desprovida de fulereno (que silenciou 22,2% da GFP), a preparação com C₆₀ na razão molar C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:5 promoveu um incremento do silenciamento da GFP da ordem dos 25%. Os complexos preparados a partir destas duas formulações, isto é, DOTAP:DOPE (1:2) sem e com C₆₀ (neste último caso na razão molar C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:5) foram caracterizados em termos de tamanho e potencial Zeta. Embora estes complexos não tenham diferido no potencial Zeta (em ambos os casos negativo e apresentando valores de $-27,93 \pm 0,82$ mV e de $-27,73 \pm 2,02$ mV quando preparados a partir da formulação lipossómica sem e com C₆₀, respetivamente), apresentaram uma diferença assinalável nas dimensões. Assim, a presença de C₆₀ promoveu um aumento de tamanho dos complexos de $318,6 \pm 2,69$ nm (na ausência de C₆₀) para $588,7 \pm 11,9$ nm (na presença de C₆₀).

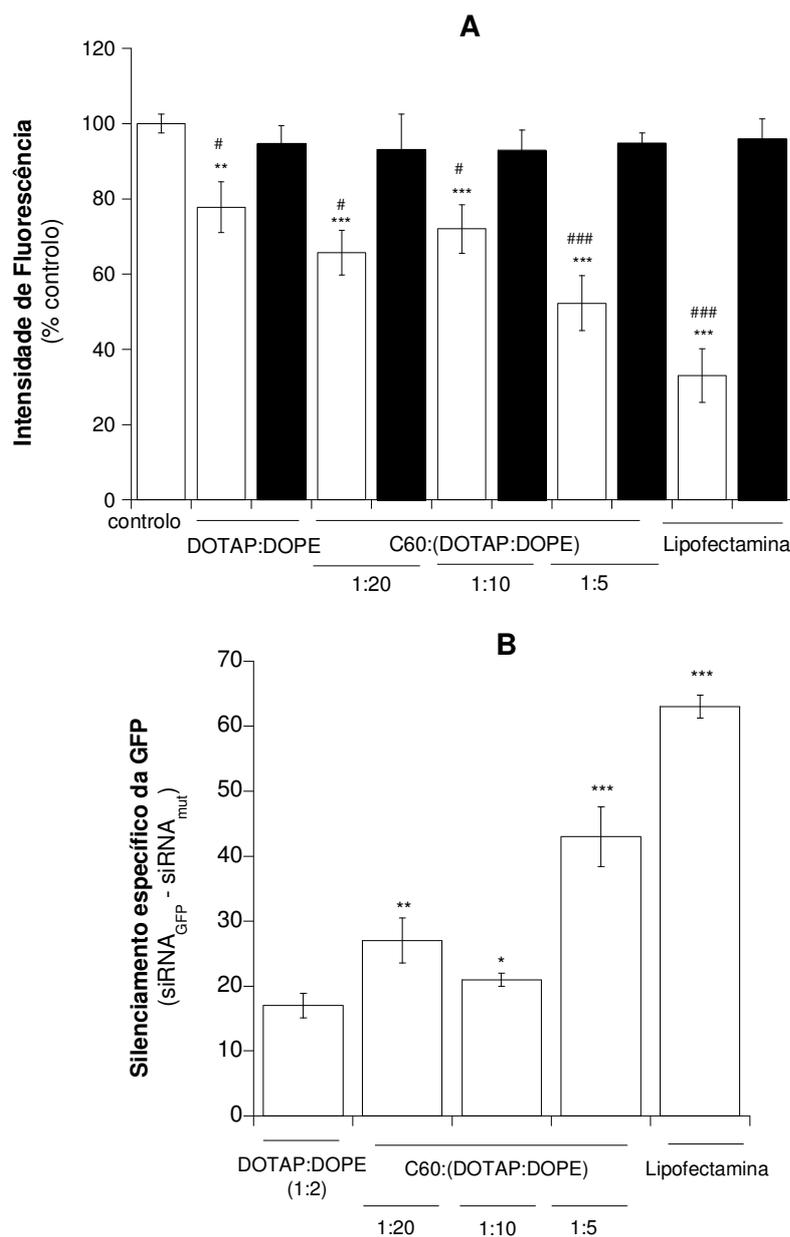


Figura 27 – Silenciamento de GFP em células HT-1080 utilizando complexos constituídos por lipossomas de DOTAP:DOPE (na razão molar de 1:2) incluindo ou não nanopartículas de C₆₀ (nas razões molares C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:20; 1:10 e 1:5) com siRNA_{GFP} (barras brancas em A) ou siRNA_{mut} (barras pretas em A), a uma razão de carga (+/-) de 1/1,5. As duas barras da direita em A correspondem a complexos de LipofectaminaTM 2000 com siRNA_{GFP} (barra branca) e com siRNA_{mut} (barra preta). Em A representa-se a intensidade de fluorescência, que reflete a expressão de GFP, em percentagem do controlo (células HT-1080 não transfectadas). Os valores experimentais correspondem à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes. Os valores representados em B (derivados de A) foram obtidos subtraindo as alterações de intensidade de fluorescência em relação ao controlo obtidas com o siRNA_{mut} (representativas do silenciamento não específico) das alterações equivalentes obtidas com o siRNA_{GFP} (representativas do silenciamento específico e não específico), que designamos na ordenada como silenciamento específico de GFP (siRNA_{GFP} - siRNA_{mut}). Em A, os valores de intensidade de fluorescência de células tratadas com os complexos formados por cada uma das formulações lipossômicas ou Lipofectamina e siRNA_{GFP} foram comparados com os de células sem tratamento (controlo), * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 e com os de células tratadas com os complexos correspondentes mas contendo siRNA_{mut} # p<0,05 e ### p<0,001. Em B, os valores derivados para as formulações com C₆₀ foram comparados com os das formulações sem C₆₀, isto é, DOTAP:DOPE (1:2), * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. Em todos os casos utilizou-se o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”.

Como é mostrado na Fig. 27A, os complexos preparados com o siRNA_{mut} praticamente não afetaram a expressão da GFP, o que significa que o silenciamento promovido pelas várias formulações de complexos foi específico, e não sofreram as células interferência inespecífica dos componentes dos complexos na expressão das suas proteínas. A Fig. 27B evidencia a especificidade do silenciamento de GFP levado a cabo pelas diferentes formulações, mostrando, para cada formulação, as alterações entre os valores de silenciamento da proteína GFP na presença de siRNA_{GFP} e na presença de siRNA_{mut}. É notório que os complexos C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA_{GFP} preparados na razão molar C₆₀:(DOTA+DOPE) de 1:5 e na razão de carga (+/-) de 1/1,5 (Fig. 27B) promoveram um decréscimo da expressão da GFP de 43%, ou seja cerca de 2,5 vezes superior ao causado pela formulação lipossômica na ausência de C₆₀. Com o reagente comercial, a LipofectaminaTM 2000, a expressão da GFP diminuiu bastante mais significativamente (67%), contudo este reagente mostrou-se o mais tóxico entre todas as formulações ensaiadas, como se ilustra na Fig. 28.

Efetivamente, a determinação da viabilidade celular pelo método de Alamar blue, após incubação das células HT-1080 com os complexos atrás mencionados (Fig. 28), mostrou que nenhuma das formulações ensaiadas, à exceção da Lipofectamina exerceu toxicidade naquelas células.

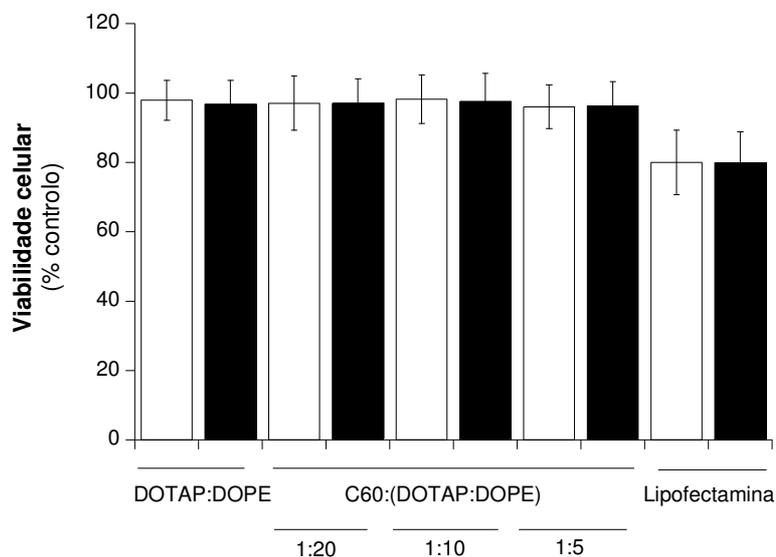


Figura 28 – Efeito dos complexos DOTAP:DOPE/siRNA e C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA contendo siRNA_{GFP} (barras brancas) e siRNA_{mut} (barras pretas) na viabilidade das células HT-1080. As duas barras da direita correspondem a complexos de LipofectaminaTM 2000 com siRNA_{GFP} (barra branca) e com siRNA_{mut} (barra preta). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar blue, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células HT-1080 não transfectadas), correspondendo à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes.

As células U87 de glioblastoma humano, modificadas para expressarem a proteína GFP, foram igualmente utilizadas para avaliar o silenciamento promovido por complexos contendo na sua composição nanopartículas de C₆₀ e os lípidos DOTAP:DOPE na razão molar de 1:2. Nestes ensaios, manteve-se a razão molar C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:5, mas fez-se variar na preparação dos complexos a razão de carga (+/-) entre (1/1,5) e (6/1). Como se pode observar na Fig. 29, os complexos C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA, na razão de carga (+/-) 6/1 promoveram o maior nível de silenciamento (53,7%) da GFP nas células U87, apenas ligeiramente inferior ao observado com a formulação lipossômica desprovida de nanopartículas de C₆₀ (58,5%). É de realçar que a esta razão de carga, o silenciamento promovido pela formulação C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA foi específico para a proteína GFP, pois na presença de siRNA_{mut} não se observou qualquer silenciamento. Assim, calculando as diferenças entre os valores de silenciamento obtidos com o siRNA_{GFP} e com o siRNA_{mut} (Fig. 30), foi possível evidenciar que, tanto na presença como na ausência de nanopartículas de C₆₀, as formulações com maior eficiência de transfecção foram obtidas nas razões de carga (+/-) de 6/1. Nestas condições, a formulação com C₆₀ mostrou-se mais eficaz do que a constituída só por lípidos (valores de silenciamento específico de GFP de 50,7% e 39,9% na presença e na ausência de C₆₀, respetivamente).

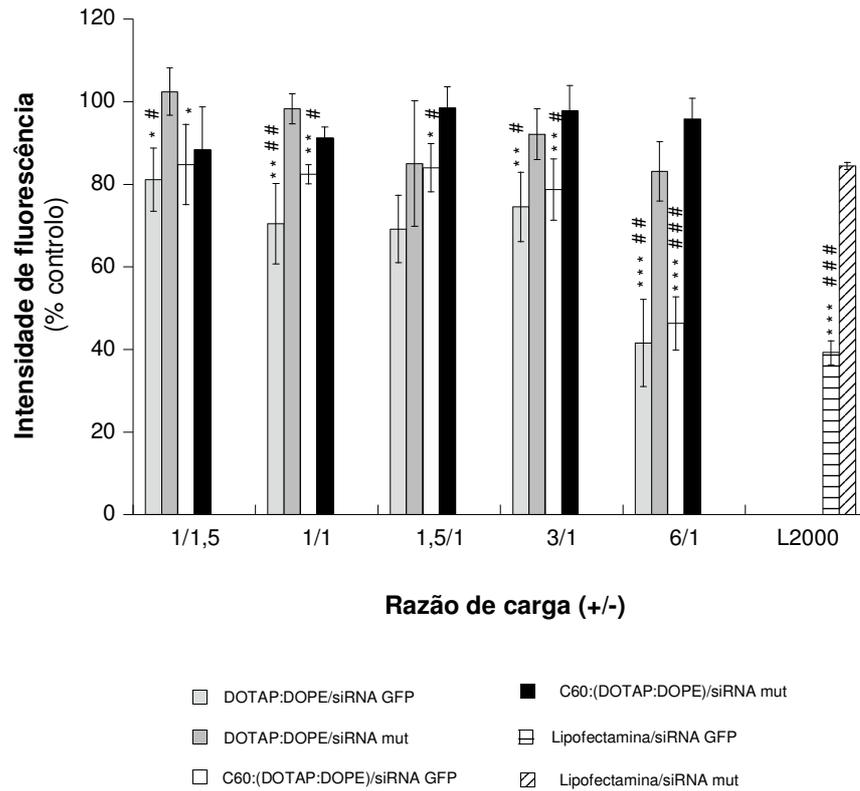


Figura 29 – Efeito da razão de carga dos complexos DOTAP:DOPE/siRNA (barras a cinzento claro e escuro) e C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA (barras a preto e branco) no silenciamento de GFP em células U87, utilizando siRNA_{GFP} (barras a cinzento claro e brancas) ou siRNA_{mut} (barras a cinzento escuro e pretas). A razão molar entre os lípidos DOTAP:DOPE foi mantida constante (1:2) bem como a razão molar de C₆₀:(DOTAP+DOPE) (1:5). As duas barras da direita correspondem a complexos de LipofectaminaTM 2000 (L2000) com siRNA_{GFP} (barra com linhas na horizontal) e com siRNA_{mut} (barra com linhas inclinadas). A intensidade de fluorescência reflete a expressão de GFP. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células U87 não transfectadas), correspondendo à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes. Os valores de intensidade de fluorescência de células tratadas com os complexos formados por cada uma das formulações lipossômicas ou Lipofectamina e siRNA_{GFP} foram comparados com os de células sem tratamento (controlo), * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 e com os de células tratadas com os complexos correspondentes mas contendo siRNA_{mut} # p<0,05, ##p<0,01 e ### p<0,001. Em todos os casos utilizou-se o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”.

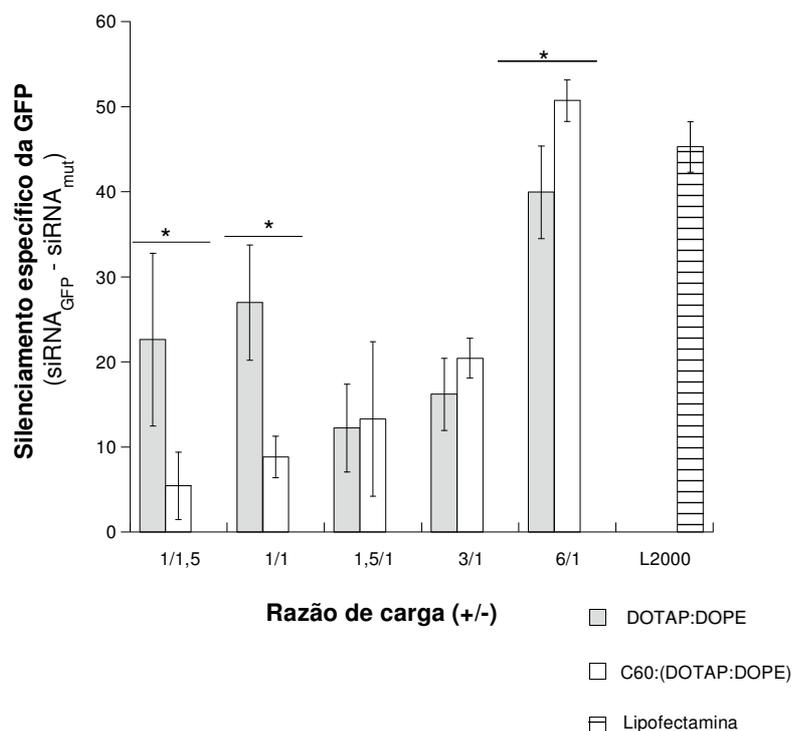


Figura 30 – Efeito da razão de carga dos complexos constituídos por siRNA e lipossomas de DOTAP:DOPE na razão molar de 1:2 sem e com nanopartículas de C₆₀ incorporadas a uma razão molar C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:5, no silenciamento de GFP em células U87. A última barra da direita corresponde a complexos de Lipofectamina™ 2000 (L2000). Os valores representados nesta figura foram derivados dos valores da Figura precedente (Fig. 29), subtraindo as alterações de intensidade de fluorescência em relação ao controlo obtidas com o siRNA_{mut} (representativas do silenciamento não específico) das alterações equivalentes obtidas com o siRNA_{GFP} (representativas do silenciamento específico e não específico), que designamos na ordenada como silenciamento específico de GFP (siRNA_{GFP} – siRNA_{mut}). Os valores derivados para as formulações com C₆₀ foram comparados com os das formulações sem C₆₀, isto é, DOTAP:DOPE (1:2), utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p<0,05.

O efeito dos complexos na viabilidade das células U87 foi também avaliado, conforme é ilustrado na Fig. 31. Todas as formulações mostraram alguma toxicidade nas células U87, particularmente acentuada para a maior razão de carga (+/-), isto é, de 6/1. Nestas condições, a formulação contendo C₆₀ e siRNA_{GFP} promoveu um decréscimo da viabilidade celular de 26%. Efeito semelhante foi observado na presença do reagente comercial, a lipofectamina, traduzindo-se por uma redução da viabilidade celular de 19%.

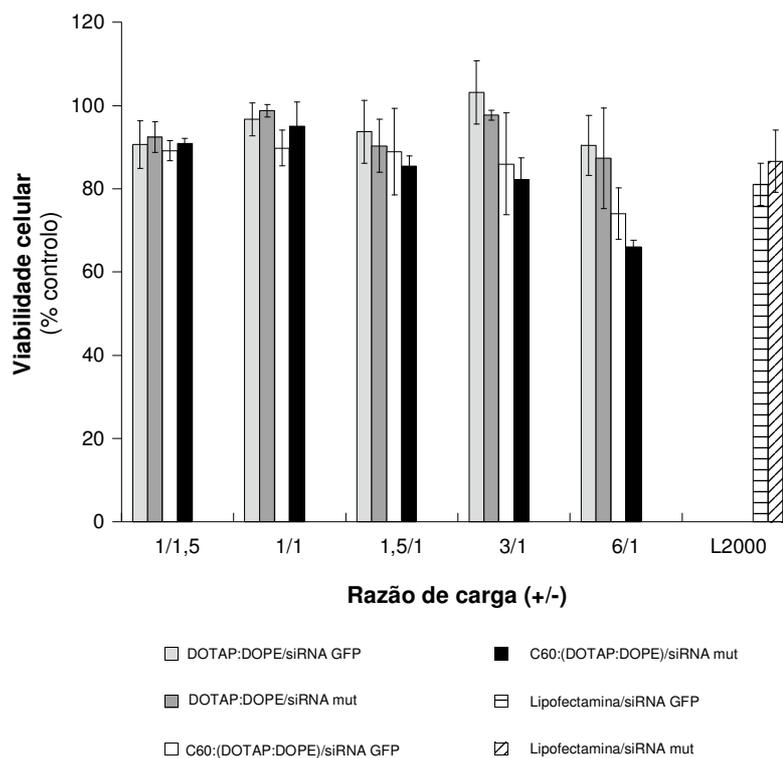


Figura 31 – Efeito da razão de carga dos complexos DOTAP:DOPE/siRNA (barras a cinzento claro e escuro) e C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA (barras a branco e preto) contendo siRNA_{GFP} (barras a cinzento claro e branco) e siRNA_{mut} (barras a cinzento escuro e preto) na viabilidade das células U87. As duas barras da direita correspondem a complexos de LipofectaminaTM 2000 (L2000) com siRNA_{GFP} (barra com linhas horizontais) e com siRNA_{mut} (barra com linhas inclinadas). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar blue, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células U87 não transfectadas), correspondendo à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes.

Os complexos DOTAP:DOPE/siRNA_{GFP} e C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA_{GFP} na razão de carga (+/-) de 6/1 foram caracterizados em termos de tamanho e potencial Zeta e, à semelhança do que tinha sido observado para as formulações equivalentes (com e sem C₆₀) que maior silenciamento promoveram nas células HT-1080, as dimensões da formulação com C₆₀ ($527,6 \pm 26,2$ nm) foram significativamente superiores às da formulação sem nanopartículas ($268,9 \pm 13,26$ nm), embora os valores de potencial Zeta tivessem sido semelhantes ($6,14 \pm 1,2$ mV e $7,43 \pm 1,15$ mV, respetivamente). Comparando as características físicas destes complexos com uma razão de carga (+/-) de 6/1 com as dos utilizados nas células HT-1080, com uma razão (+/-) de 1/1,5, é notória a diferença no potencial Zeta que, como seria de esperar, nos primeiros é positivo, ao passo que nos últimos é negativo. Em relação ao tamanho, a razão de carga (+/-) não teve grande influência, já que os lipoplexos preparados só a partir da mistura lipídica DOTAP/DOPE

apresentaram dimensões entre 269 e 319 nm para as razões de carga 1/1,5 e 6/1, respectivamente, e as formulações com C₆₀ tiveram, nas mesmas condições, dimensões de 528 e 589 nm. Atendendo ao tamanho dos complexos C₆₀:(DOTAP:DOPE)/siRNA (>500 nm) é de prever que a sua via de internalização nas células seja a macropinocitose. Por outro lado, é interessante notar que a carga superficial negativa dos complexos não obsteu à sua internalização nas células HT-1080. Aparentemente, o sucesso na entrega de siRNA nas células U87 foi porém comprometido por essa carga superficial negativa. Eventualmente, a repulsão dos complexos negativos seria maior nas células U87, impedindo a entrada devido à presença de uma extensa guarnição de glicolípidos com carga negativa (gangliósidos) que é característica das células neuronais.

3.3.3.2 Nanopartículas de C₆₀ na entrega de pDNA em modelos celulares

Para avaliar a capacidade das nanopartículas de C₆₀ constituírem um vetor de DNA plasmídico, utilizaram-se células HeLa como modelo celular e um plasmídeo para a proteína-repórter GFP, designado no texto de pGFP. Assim, foram preparadas dispersões aquosas de DOTAP:DOPE nas razões molares 1:2 e 1:6 incluindo ou não nanopartículas de C₆₀, tendo sido ensaiadas formulações com razões molares C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:10 e 1:100. Os complexos constituídos pela mistura de DOTAP:DOPE ou C₆₀:(DOTAP:DOPE) com pGFP foram preparados nas razões de carga (+/-) de 1/1 e 2/1. Estas razões de carga foram escolhidas com base em estudos anteriores realizados no nosso laboratório com outros complexos (Cardoso et al., 2013). Como controlo positivo foi utilizada a LipofectaminaTM 2000. A Fig. 32 mostra a percentagem de células transfectadas utilizando os diferentes tipos de complexos. É notório que tanto os complexos DOTAP:DOPE/pGFP como os complexos C₆₀:(DOTAP:DOPE)/pGFP (preparados nas razões de carga (+/-) e nas razões molares previamente mencionadas) não promoveram a transfecção das células HeLa, ao contrário da Lipofectamina que transfectou cerca de 80% dessas células.

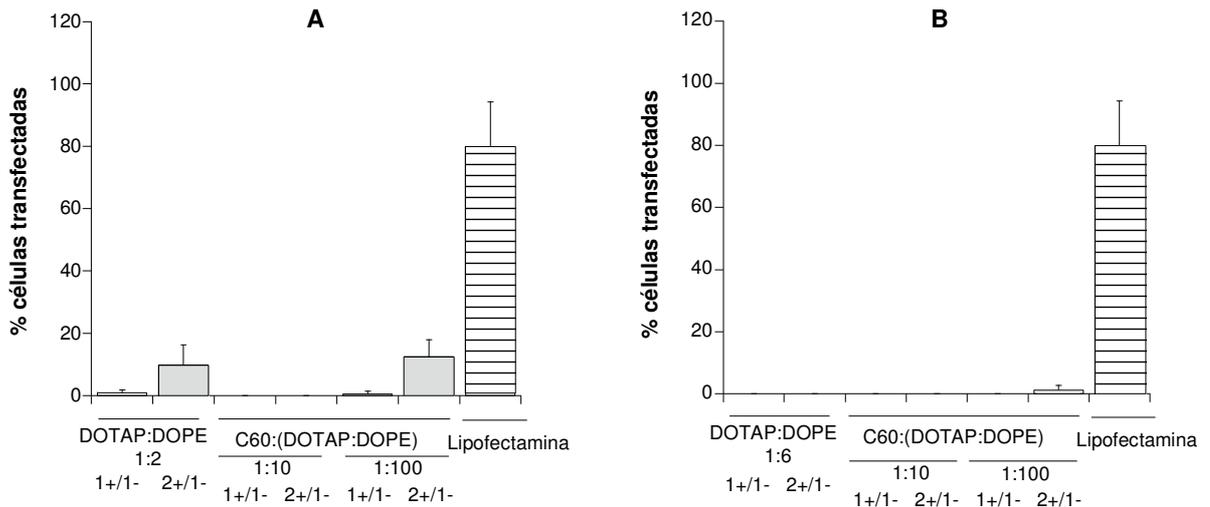


Figura 32 – Eficiência de transfecção dos complexos (DOTAP:DOPE)/pGFP e C₆₀:(DOTAP:DOPE)/pGFP nas células HeLa para as razões molares entre os lípidos DOTAP:DOPE de 1:2 (A) e 1:6 (B). As nanopartículas de C₆₀ foram incorporadas nos lipossomas de DOTAP:DOPE de forma a obter as razões molares entre os lípidos e as nanopartículas de C₆₀ de 1:10 e de 1:100. Foram ensaiadas as razões de carga (+/-) entre os lipossomas (com ou sem C₆₀) e pGFP de 1/1 (barras a branco) e 2/1 (barras a cinzento). Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células não tratadas), correspondendo à média ± desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes.

A citotoxicidade dos complexos foi avaliada determinando a viabilidade as células HeLa pelo método de Alamar blue (Fig. 33). Ao contrário da Lipofectamina que diminuiu em cerca de 30% a viabilidade celular, os complexos preparados a partir da formulação lipossômica de DOTAP:DOPE, contendo ou não nanopartículas de C₆₀, não apresentaram toxicidade para as células HeLa.

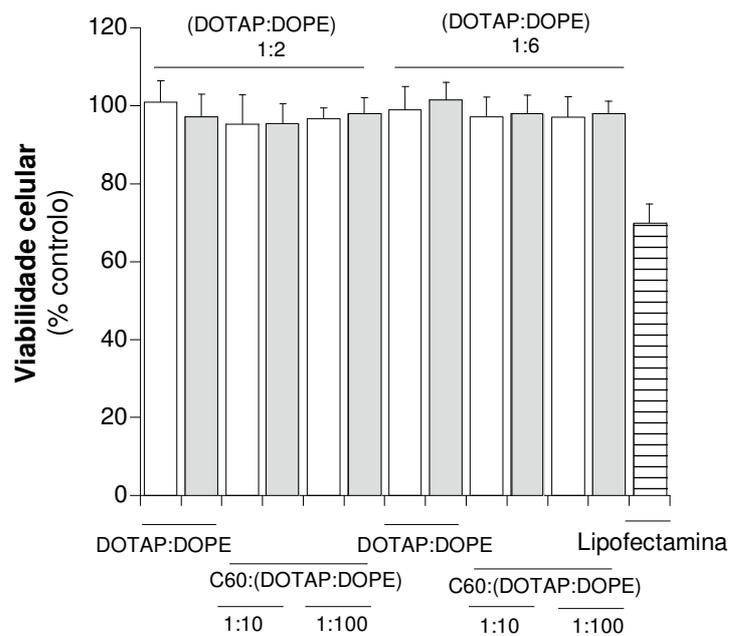


Figura 33 - Efeito dos complexos (DOTAP:DOPE)/pGFP e C_{60} :(DOTAP:DOPE)/pGFP na viabilidade das células HeLa. As barras a branco correspondem a uma razão de carga (+/-) entre os lipossomas (com e sem C_{60}) e pGFP de 1/1 e as barras a cinzento, a uma razão de carga (+/-) de 2/1. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar blue, conforme descrito na secção de Materiais e Métodos. Os valores experimentais estão expressos em percentagem do controlo (células HeLa não transfectadas), correspondendo à média \pm desvio-padrão de triplicados de 3 ensaios independentes.

Capítulo 4

Discussão

Depois de mais de duas décadas de investigação básica e aplicada no âmbito da Nanotecnologia, os materiais que emergiram dessa área tecnológica invadem hoje o Mercado, estando presentes na vida quotidiana dos consumidores dos países mais economicamente desenvolvidos. Em Março de 2011, constavam 1317 produtos no inventário de produtos nanotecnológicos disponíveis em 30 países diferentes (The Nanotechnology Consumer Products Inventory; Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, DC, 2006; published online at <http://www.nanotechproject.org/consumerproducts>). A maior parte desses produtos (738) incluíam-se na categoria “Saúde e bem-estar”, que comporta artigos de higiene pessoal, cosméticos, vestuário, artigos desportivos e protetores solares. Números consideravelmente menores foram mencionados no referido inventário nas categorias de “artigos domésticos e de jardim” (incluindo tintas), “artigos alimentares” e “artigos eletrónicos ou de computador”. Uma grande parte dos produtos reportados (587) tinha origem em empresas dos EUA, seguindo-se os provenientes de empresas europeias (367) e da Ásia Oriental (261). De acordo com o referido Inventário, só um número muito pequeno de materiais são explicitamente indicados na descrição da composição dos produtos nanotecnológicos que aparecem no mercado. Entre os mais comumente mencionados, contam-se a prata, o carbono (incluindo os fulerenos), o titânio, a sílica, o zinco e o ouro.

A expansão comercial dos nanomateriais fez com que recrudescessem as preocupações relativas a uma eventual contaminação ambiental e ao seu potencial impacto na saúde humana. Temia-se que as propriedades peculiares que tornavam esses materiais tão atraentes para as mais diversificadas aplicações pudessem igualmente estar na base de efeitos imprevisíveis ao nível da saúde e do ambiente. Assim, entidades governamentais, indústrias e unidades de investigação em todo o Mundo envidaram esforços no sentido de que os benefícios indiscutíveis do emergente avanço das nanotecnologias pudessem ser usufruídos minimizando os potenciais riscos de toxicidade. Em 2006, foi publicado um artigo na *Nature* (Maynard et al., 2006) alertando para a necessidade de, nos 15 anos seguintes, serem desenvolvidas e validadas baterias de testes que criteriosamente avaliassem a toxicidade de nanomateriais, apresentando-se como alternativa fiável aos ensaios *in vivo*. Em virtude da enorme diversidade de materiais nano-estruturados, diferindo em tamanho, forma geométrica, composição química, revestimento, propriedades físico-químicas, impunha-se como premente o estabelecimento de correlações entre essas características e a toxicidade, de forma a que pudessem ser desenhados nanomateriais que preservassem as características benéficas, suprimindo as indesejáveis.

Em 2008, a Europa financiou o projeto ENRHES (Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety; <http://nmi.jrc.ec.europa.eu/project/ENRHES.htm>) destinado a recolher a informação disponível relativa à exposição a diferentes classes de nanomateriais e aos riscos decorrentes dessa exposição não só ao nível do consumidor individual, como a nível ocupacional (trabalhadores que lidam com os produtos) e ambiental.

Foi neste contexto, que se desenvolveu o projeto em que se enquadra o presente trabalho de Tese. Os fulerenos foram os nanomateriais escolhidos para este estudo pela importância que assumiam a vários níveis, nomeadamente industrial. À data a que este projeto se iniciou, tinha sido recentemente criada uma unidade de produção em grande escala de fulereno no Japão, permitindo a produção de uma alta tonelagem por ano (Nielsen et al., 2008). Por outro lado, para além de adequados a várias aplicações técnicas (por exemplo em pilhas solares, em virtude da alta afinidade dos fulerenos por eletrões e a sua capacidade de transportar carga), os fulerenos emergiam como interessantes candidatos a uma nova geração de fármacos, aproveitando, por exemplo, as suas propriedades antioxidantes e de supressão de radicais. A fim de que pudesse ser estudada a influência das características físico-químicas dos nanomateriais na sua interação com sistemas biológicos, foram selecionados para o presente trabalho dois tipos de fulerenos: o original ou primitivo (“*pristine*” em inglês) com 60 átomos de carbono (C_{60}) e o que resultou dele por adição de grupos hidroxilo, designadamente $C_{60}(OH)_{18-22}$, por se encontrarem disponíveis comercialmente. Se este último, sendo solúvel em água, não ofereceu qualquer dificuldade na preparação de uma solução adequada a ser administrada a sistemas biológicos, já o mesmo não aconteceu com o primeiro. C_{60} é praticamente insolúvel em água (solubilidade inferior a 0,1 ng/L (Bedrov et al., 2008)) e tem uma solubilidade de 1,4 mg/L, 11 mg/L e 3000 mg/L em etanol, tetra-hidrofurano e tolueno, respetivamente (Kulkarni e Jafvert, 2007). Tínhamos conhecimento de vários protocolos de preparação de suspensões aquosas de C_{60} . O mais comum consistia em adicionar uma solução de C_{60} num solvente orgânico a água, procedendo em seguida à extração, pretensamente completa, do solvente. Desta forma, C_{60} forma agregados moleculares (partículas coloidais) em suspensão em água. O protocolo foi otimizado, utilizando como solvente orgânico o tolueno, conforme descrito na secção de Material e Métodos. As suspensões em água das partículas coloidais de C_{60} exibiram, como está descrito na literatura, uma cor de ferrugem, muito pálida, a uma cor forte e escura castanha-avermelhada, dependendo da concentração de C_{60} . As nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ apresentaram dimensões médias de 32,9 e

2,6 nm, respetivamente, mostrando o primeiro fulereno um nível de agregação molecular muito superior ao do segundo. O potencial Zeta das nanopartículas de ambos os fulerenos exibiu um valor negativo (-24,8 e -36,7 mV para o C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$, respetivamente). De acordo com Andrievsky e colaboradores (2002), as suspensões aquosas de C_{60} são constituídas por moléculas isoladas no estado hidratado e por pequenos agregados esféricos dessas moléculas com diferentes tamanhos. Embora desprovidas de grupos ionogénicos, as partículas coloidais de C_{60} apresentam, segundo aqueles autores, uma carga negativa superficial devido à polarização das moléculas de água nas suas imediações. Em virtude da grande mobilidade dos eletrões nas orbitais moleculares π ligantes semipreenchidas e espacialmente sobrepostas, a molécula de C_{60} é muito polarizável (propriedade que lhe permite a auto-organização em estruturas supra-moleculares sólidas cristalinas), pelo que da interação dos aglomerados de C_{60} com as moléculas de água resulta a formação de uma camada de hidratação na qual as moléculas de água devem ter uma orientação definida e menor mobilidade do que as moléculas de água vizinhas. A presença de uma camada de hidratação estável a envolver os aglomerados de fulereno, na qual as moléculas de água estão ligadas entre si por pontes de hidrogénio, permite compreender não só a carga negativa superficial exibida pelas nanopartículas de C_{60} em suspensões aquosas como a sua estabilidade temporal nos diferentes meios aquosos. Curiosamente, a água induz interações de carácter repulsivo entre as moléculas de fulereno (Bedrov et al., 2008), em oposição ao que acontece com solutos orgânicos não polares, em que a água promove, por um processo conduzido entropicamente, a formação de agregados estabilizados por interações hidrofóbicas.

Uma vez que para uma correta e abalizada interpretação dos mecanismos moleculares subjacentes à atividade biológica dos fulerenos é necessário ter em consideração o estado de agregação das moléculas de fulereno (ou seus derivados), as nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ foram não só caracterizadas nas suspensões de armazenamento, como também nos meios utilizados para preparação do material biológico (salinos e tamponizados a pH fisiológico), nos quais as suspensões originais de nanopartículas foram diluídas. É assinalável que as dimensões e o potencial Zeta das nanopartículas foram essencialmente preservados nesses meios após diluição das suspensões de origem.

Como ponto de partida para uma abordagem toxicológica das nanopartículas de fulereno, a sua interação com modelos membranares e membranas nativas foi investigada neste trabalho.

As membranas celulares são frequentemente o primeiro local de contacto (na ausência de uma parede celular) e a barreira mais universal para xenobióticos, embora possa também ser um dos alvos mais vulneráveis para moléculas lipofílicas que incorporam na sua matriz lipídica. Portanto, o estudo das interações dos fulerenos com biomembranas emerge naturalmente como uma etapa importante para prever o potencial dano que estas nanopartículas podem causar nos organismos. Foi desta forma decisivo, para a continuidade deste trabalho, ter observado, por estudos de supressão de fluorescência, que ambos os fulerenos partilham extensivamente tanto em membranas de lípidos sintéticos (DPPC) como em membranas nativas (mitocôndrias). A utilização de duas sondas fluorescentes (2-AS e 16-AP) que monitorizam regiões distintas da bicamada (região mais próxima da interface lípido-água no caso de 2-AS e região central da bicamada, no caso de 16-AP) permitiu ainda verificar que as nanopartículas de C_{60} e de $C_{60}(OH)_{18-22}$ incorporam em regiões distintas da membrana: as primeiras, preferencialmente no interior hidrofóbico e as segundas, mais próximo dos grupos polares dos fosfolípidos. Estes resultados estão em clara concordância com os obtidos por estudos de simulação de dinâmica molecular (Qiao et al., 2007; Bedrov et al., 2008). Assim, segundo os estudos efetuados por Qiao e colaboradores (2007), as moléculas de C_{60} , ao interagirem com membranas, adsorvem à região mais profunda da bicamada, ficando envolvidas pelas cadeias hidrocarbonadas dos lípidos membranares, ao passo que as moléculas de um seu derivado hidroxilado ($C_{60}(OH)_{20}$) tendem a permanecer à superfície da membrana, sendo a penetração em maior profundidade na bicamada impedida em virtude da sua hidrofiliidade, bem superior à das moléculas-mãe. Os autores acrescentam que a translocação das moléculas de $C_{60}(OH)_{20}$ através de uma bicamada de DPPC por difusão Browniana é muito menos favorável do que a de moléculas de C_{60} , estimando um tempo médio de translocação para as primeiras moléculas nove ordens de grandeza superior ao das segundas. De acordo com Bedrov e colaboradores (2008), a molécula de C_{60} tem propriedades muito peculiares, não sendo nem hidrofóbica nem hidrofílica, razão porque apresenta uma permeabilidade através da membrana surpreendentemente elevada e atravessa a barreira hemato-encefálica, apesar dos seus 720 Daltons. Tal facto, deve-se à sua translocação através da bicamada não ser limitada nem pela região dos grupos polares dos fosfolípidos (ao contrário do que seria esperado para uma molécula hidrofóbica com as mesmas dimensões), nem pela região altamente hidrofóbica do interior da bicamada, como sucederia para uma molécula hidrofílica.

Obviamente, estas considerações pressupõem que as nanopartículas de C_{60} nas suspensões aquosas apresentem um equilíbrio dinâmico entre grandes agregados moleculares (com cerca de 35 nm, como observado no presente trabalho) e moléculas livres que, preferencialmente, partilham na membrana. Esta hipótese é apoiada pelos estudos de simulação de Li e colaboradores (2007a) que propuseram que a partilha de nanopartículas isoladas de C_{60} no ambiente anisotrópico da membrana é favorecida em relação aos agregados dessas partículas, os quais, para serem acomodados dentro da membrana, provocariam alterações estruturais da bicamada (distorções mecânicas da sua organização empacada) com elevados custos energéticos. Assim, muito embora não se esperassem alterações na integridade física da membrana por incorporação de moléculas individuais de C_{60} dentro da espessura (com cerca de 5 nm) da bicamada lipídica, estudos anteriores efetuados no nosso laboratório (Jurado et al., 1991; Videira et al., 2001, 2002; Monteiro et al., 2003, 2011a, 2011b, 2013a) tornavam expectável que pequenas modificações das propriedades físicas da membrana pudessem ter impacto funcional nos sistemas biológicos.

Estavam, deste modo, lançadas as bases para dar continuidade a este projeto, no sentido de avaliar o impacto das interações membranares dos fulerenos em funções celulares associadas à membrana. Para esse efeito, a mitocôndria surgiu como um interessante material de estudo. Efetivamente, a bioenergética mitocondrial depende em grande parte de reações que ocorrem ao nível da membrana (membrana interna da mitocôndria, MIM). Acrescia, ainda, existir uma vasta experiência no nosso laboratório de estudos efetuados em mitocôndrias como modelos para avaliar a toxicidade de uma grande variedade de poluentes e que apontavam para a influência determinante que as perturbações induzidas por esses compostos nas propriedades físicas da membrana exerciam sobre os efeitos dos mesmos a nível mitocondrial (Palmeira et al., 1995; Videira et al., 2001; Moreno et al., 2007; Pereira et al., 2009). As mitocôndrias utilizadas foram isoladas de fígado de rato, não só pela facilidade com que é possível obter uma fração mitocondrial relativamente pura a partir deste órgão, como pelo facto de o fígado ser o principal órgão de acumulação e metabolização de compostos tóxicos. Por outro lado, atendendo a que as mitocôndrias exibem notórias semelhanças com os seus ancestrais procarióticos e são numerosas as evidências de que as proteínas mitocondriais sofreram uma evolução muito conservativa (Esser et al., 2007), os resultados toxicológicos com mitocôndrias de uma dada espécie animal (por exemplo, rato) são previsivelmente reproduzíveis em mitocôndrias de outras espécies animais (por exemplo, humanas).

Neste contexto, tinham sido realizados recentemente no nosso laboratório estudos com três compostos de interesse farmacológico, mas com reportada toxicidade para a mitocôndria, designadamente FCCP (Monteiro et al., 2011a), um clássico dissociador da fosforilação oxidativa da mitocôndria, nimesulide (Monteiro et al., 2011b), um anti-inflamatório não esteroide conhecido por ter um efeito dissociador da fosforilação oxidativa mitocondrial e menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona ou vitamina K₃) (Monteiro et al., 2013a), uma cetona aromática policíclica que, ao ser reduzida ao nível do complexo I da mitocôndria, desvia o fluxo de eletrões do seu percurso normal, dando lugar a uma semi-quinona (radical) que, por sua vez, reduz oxigénio molecular a anião superóxido, conduzindo um ciclo redox fútil. Foi demonstrado que parte dos efeitos exercidos na mitocôndria por aqueles compostos poderiam ser mecanisticamente relacionados com as alterações que produzem ao nível da estrutura e organização dos lípidos de membranas-modelo, preparadas de forma a mimetizar a MIM. Interessantemente, foi também demonstrado que a modificação da composição lipídica de MIM, induzida pela dieta em ratos, modelava os efeitos daqueles três compostos na bioenergética mitocondrial, mais uma vez realçando a importância das interações moleculares dos compostos com os lípidos membranares para a atividade tóxica dos mesmos ao nível da mitocôndria (Monteiro et al., 2013b).

Nesta mesma perspetiva, tendo em conta os efeitos diferenciais dos fulerenos na respiração mitocondrial em estado 4 (C₆₀ afetando-a muito mais severamente do que C₆₀(OH)₁₈₋₂₂), é legítimo inferir que as propriedades físicas da MIM, com eventual repercussão na permeabilidade a prótons, foram diferentemente afetadas pelas nanopartículas de C₆₀ e de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂. Tal facto pode ser atribuído às diferentes concentrações efetivas daqueles compostos na membrana (em virtude dos diferentes coeficientes de partilha) e/ou à sua diferente distribuição na membrana (as nanopartículas de C₆₀ mais profundamente incorporadas na membrana do que as de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂, como foi referido atrás). De acordo com os estudos de simulação de Quiao e colaboradores (2007), as moléculas do fulereno hidroxilado (C₆₀(OH)₂₀) ao adsorverem à superfície da bicamada promovem um decréscimo no espaçamento dos grupos polares dos fosfolípidos, devido às fortes interações estabelecidas entre estes e os grupos hidroxilo do fulereno, ficando, assim, a membrana menos permeável. Pelo contrário, as moléculas de C₆₀ promovem um afastamento dos grupos polares dos fosfolípidos criando microporos que não só favorecem a permeação daquelas moléculas, que atingem as regiões mais profundas da bicamada como referido atrás, como criam condições para a perda de permeabilidade da membrana a

outras pequenas moléculas ou íons (por exemplo, no caso da mitocôndria, contribuindo para a difusão passiva de prótons para a matriz, de acordo com o seu gradiente de concentração). Segundo os mesmos autores, as diferentes interações dos fulerenos com a membrana, com diferentes repercussões ao nível das suas propriedades físicas, podiam constituir a base mecânica para a distinta citotoxicidade manifestada pelas partículas do fulereno hidroxilado em relação ao fulereno primitivo.

Outro aspeto interessante no presente trabalho consiste no facto de os efeitos induzidos por ambos os fulerenos na bioenergética mitocondrial terem mostrado independência em relação ao substrato respiratório utilizado, ou seja ao local de ativação do sistema de transporte de eletrões (vulgarmente designado por cadeia respiratória), isto é, a partir do Complexo I ou do Complexo II. Este facto sugere uma ação relativamente não específica nos complexos do sistema respiratório mitocondrial, o que frequentemente se associa a um efeito não direto nas proteínas, mas, pelo contrário, a um efeito indireto, mediado por alterações do ambiente lipídico das proteínas. No entanto, não se pode excluir uma segunda hipótese, isto é, uma interação direta dos fulerenos com os complexos III e/ou IV do sistema respiratório que, a ser lesiva especificamente para estes complexos, se teria traduzido também por um efeito indiferenciado com os substratos glutamato/malato (que suportam a respiração a partir do complexo I) ou por succinato (a partir do complexo II) utilizados no presente estudo. A confirmar-se a primeira hipótese, ou seja uma ação inespecífica (indireta) dos fulerenos no sistema respiratório, em detrimento desta última (que teria de ser refutada por estudos que avaliassem a ação direta das nanopartículas nos diferentes complexos do sistema respiratório), a inibição da função mitocondrial poderia advir de distúrbios causados pela incorporação membranar das nanopartículas na estabilidade dos supercomplexos respiratórios, cuja estrutura e a atividade têm sido reportadas como dependendo estritamente de interações entre lípidos, nomeadamente cardiolipina, e subunidades de vários complexos, incluindo citocromo *bc1* (complexo III) e citocromo *c* oxidase (complexo IV) (Chicco e Sparagna, 2007; Böttinger et al., 2012).

Tendo em consideração que as nanopartículas de ambos os fulerenos exibem valores negativos de potencial Zeta e que, apesar do seu diferente tamanho em suspensões aquosas, tanto umas como outras partilham fortemente nas membranas mitocondriais, as diferenças observadas entre os dois tipos de nanopartículas na bioenergética mitocondrial podem mais uma vez ser justificadas pelas diferentes características químicas de superfície desses materiais, que governam, como acima referido, a sua distribuição preferencial na membrana e a forma como afetam as suas propriedades físicas. Sabendo que a cardiolipina,

fosfolípido aniônico, também se distribui heterogeneamente na membrana, não seria surpreendente que a sua ação ao nível da mitocôndria fosse prejudicada desigualmente pelos dois fulerenos. Esse prejuízo poderia decorrer tanto das diferentes características dos dois fulerenos como da sua topologia na membrana mitocondrial, o que poderia condicionar a sua interação com a cardiolipina, ela própria detentora da capacidade de formar domínios na membrana. Alternativamente, os fulerenos poderiam competir com a cardiolipina pelos seus alvos de interação (por exemplo citocromo c), uma vez que, quando hidratados, adquiririam carga negativa.

Em suma, os estudos de bioenergética mitocondrial demonstraram que as nanopartículas de C_{60} exercem uma toxicidade mais severa do que as do fulereno hidroxilado, como previsto pelos estudos de simulação de dinâmica molecular de Quiao e colaboradores (2007) acima referidos, e sugeriram que as alterações observadas podiam resultar de um efeito subtil ao nível das propriedades físicas membranares, sem contudo comprometer a integridade da membrana, uma vez que o processo de fosforilação oxidativa era preservado nas mitocôndrias.

Outra questão que se coloca quando se trata de extrapolar resultados obtidos em estudos *in vitro* para situações *in vivo*, diz respeito à concentração dos compostos com eventual significado fisiológico. Este é um problema transversal em estudos toxicológicos, incluindo aqueles que se baseiam em ensaios de letalidade (manifestação inequívoca de toxicidade). Resultados credíveis com estes ensaios exigem um número muito elevado de animais, a fim de que possam ser usadas concentrações de composto próximas das que têm significado fisiológico real. Para obviar o sacrifício de um número grande de animais, opta-se frequentemente por ensaiar concentrações maiores num número mais restrito de organismos. Neste contexto, os estudos bioquímicos para avaliação da toxicidade, como os que realizámos com os fulerenos neste trabalho, emergem como uma boa alternativa aos testes de letalidade, esperando-se que forneçam resultados mais significativos, revelando os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos tóxicos. No entanto, idealmente, devem ser estabelecidas conexões entre os eventos moleculares estudados *in vitro* e as respostas biológicas manifestadas *in vivo*. Contudo, dois aspetos devem ser tomados em conta. Em primeiro lugar, a gama de concentrações dos compostos ensaiados em laboratório é condicionada por limitações técnicas. No presente trabalho, a gama de concentrações dos fulerenos utilizada nos estudos de bioenergética mitocondrial foi determinada pela concentração máxima a que os fulerenos se revelaram capazes de formar suspensões aquosas estáveis. Assim, as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$, sendo mais

solúveis em água do que as de C_{60} , permitiram preparar suspensões de armazenamento mais concentradas. Uma vez que os ensaios com mitocôndrias decorreram num volume de reação de 1 ml, ficou excluída a possibilidade de usar suspensões diluídas das nanopartículas que causariam uma alteração grande de volume. O outro aspeto a ter em atenção diz respeito a um conceito fundamental em Toxicologia: o limiar de deteção. Este é importante não só no trabalho experimental em laboratório, em que depende da sensibilidade da técnica e do equipamento, como nos estudos *in vivo*, uma vez que os organismos lidam de forma diferente com diferentes compostos (aspetos toxicocinéticos relativos à biodisponibilidade dos compostos). Em relação aos fulerenos, os dados de biodisponibilidade são escassos na literatura. No entanto, um estudo de revisão levado a cabo por Aschberger e colaboradores (2010) reporta como estimativa uma concentração de fulereno de 0,5% em cremes usados como cosméticos (considerados uma das maiores fontes de exposição humana aos fulerenos). Com efeito, esta concentração é da mesma ordem de grandeza das concentrações usadas neste trabalho e em ensaios *in vitro* reportados na literatura. Em suma, embora outros estudos devam ser feitos a fim de prever com segurança a toxicidade dos fulerenos *in vivo*, a abordagem bioquímica levada a cabo no presente trabalho propõe uma base mecanística da ação dos fulerenos que pode vir a ser explorada em estudos futuros.

A secção 3.2 desta dissertação enquadra-se num projeto de toxicologia ambiental que tem vindo a ser desenvolvido no nosso laboratório com vista a implementar modelos simples de avaliação da toxicidade de poluentes.

Neste contexto, a escassez de dados toxicológicos relativos a nanomateriais, entre os quais se contam os fulerenos, torna neste momento difícil prever os riscos que advêm de uma contaminação ambiental tendencialmente extensa por parte destes materiais. Esta legítima preocupação enraíza no facto de estes compostos estarem hoje presentes numa diversidade de produtos industriais, tendo-se expandido a múltiplos setores do mercado, particularmente nos países mais desenvolvidos. Desta forma, tanto a deposição no ambiente de lixos domésticos, que incluem uma variedade de consumíveis detentores desses materiais, como os desperdícios não devidamente tratados e os efluentes residuais de fábricas de diversa natureza podem estar a contribuir para colocar em perigo o delicado equilíbrio de populações terrestres e aquáticas que garante a qualidade de vida de todas as espécies deste Planeta, incluindo a humana.

Com vista a avaliar o impacto das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ na atividade dos ecossistemas, recorreu-se no presente trabalho a dois organismos-modelo (um

procariótico e outro eucariótico) como representantes típicos dos níveis tróficos mais baixos de uma cadeia alimentar (a planta aquática fotossintética *Lemna gibba* como produtor de matéria orgânica) e com um papel no ciclo de nutrientes (a bactéria *G. stearothermophilus* em representação dos decompositores). A planta aquática *Lemna gibba* tem sido muito utilizada em estudos ecotoxicológicos (Cayuela et al., 2007; Perreault et al., 2010), devido ao seu pequeno tamanho, estrutura muito simples, fácil manipulação e requisitos relativos às condições de cultura e manutenção em laboratório de fácil acesso e pouco dispendiosos. A isto, alia-se ainda uma alta taxa de proliferação vegetativa e grande sensibilidade a vários poluentes, razão pela qual a avaliação da inibição do crescimento desta planta foi proposta como um teste-padrão de toxicidade para compostos químicos contaminantes do ambiente pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA, 1996).

Por outro lado, a bactéria *G. stearothermophilus* tem-se revelado, em estudos efetuados no nosso laboratório, como um bom modelo de avaliação da atividade toxicológica de moléculas caracterizadas por uma forte interação com membranas biológicas, quer se trate de poluentes ambientais (Donato et al., 1997a, 1997b; Martins et al., 2003; Monteiro et al., 2005) ou de fármacos (Luxo et al., 1998, 2001; Rosa et al., 2000; Monteiro et al., 2003). Acresce ainda o facto de os lípidos que constituem a membrana celular desta bactéria (Jurado et al., 1991), particularmente os glicerofosfolípidos, serem estruturalmente muito semelhantes aos das células eucarióticas. Neste contexto, *G. stearothermophilus* surgiu como um modelo adequado à avaliação de toxicidade dos fulerenos, já que em estudos anteriores (secção 3.1) tínhamos demonstrado a capacidade das nanopartículas de carbono partilharem fortemente em membranas biológicas como as mitocondriais, em cuja composição se incluem lípidos como cardiolipina e fosfatidiletanolamina, igualmente presentes na membrana daquela bactéria.

Os mecanismos através dos quais as nanopartículas de fulereno exercem efeitos adversos têm sido pouco explorados. Se, por um lado, existem referências a um eventual efeito perturbador da compactação dos lípidos membranares, resultante da incorporação das nanopartículas de C₆₀ no interior hidrofóbico da bicamada lipídica, concordantemente com os nossos resultados (secção 3.1), como foi proposto por Chang e Violi (2006) com base em estudos de simulação por computador, outros estudos, como os conduzidos por Aquino et al. (2010) em *E. coli*, não suportam a instabilidade membranar como base para a inibição do crescimento bacteriano e a redução da viabilidade celular na presença daquelas nanopartículas. Nesta perspetiva, e tendo em vista a comparação dos efeitos tóxicos de

nanopartículas de fulereno diferindo na química de superfície e na partilha e localização preferencial na membrana, a bactéria *G. stearothermophilus* emergia também como um bom modelo de avaliação toxicológica pelo facto de se ter revelado capaz de discriminar a toxicidade de moléculas muito semelhantes, como os isómeros alfa e beta do inseticida endossulfão (Martins et al., 2003), o inseticida DDT e o seu metabolito DDE (Donato et al., 1997a, 2000) ou o fármaco tamoxifeno (Luxo et al., 2003) e o seu metabolito hidroxi-tamoxifeno (Monteiro et al., 2003). Além disso, a toxicidade relativa de compostos da mesma família, deduzida a partir de ensaios com este microrganismo, apresentou, em várias circunstâncias, um significativo paralelismo com a determinada em outros modelos biológicos de uso generalizado (mitocôndrias ou linhas celulares); foi o caso dos compostos DDT e DDE (Donato et al, 1997a, 1999) do herbicida metolacoloro (Pereira et al., 2009) e alacoloro (resultados não publicados) dos compostos organoestanhados com diferente número de substituintes orgânicos (Martins, 2008).

Com não menos importância, somam-se ainda como vantagens dos ensaios com esta bactéria a rapidez na obtenção de parâmetros indicadores de toxicidade, tanto a partir de experiências de crescimento em laboratório (entre 2 a 3 horas) como a partir de ensaios de consumo de oxigénio com protoplastos; a facilidade de manuseamento do microrganismo sem riscos para o operador (bactéria não patogénica) ou riscos de contaminação das culturas por outras bactérias (trata-se de um termófilo que se desenvolve a temperaturas a que as bactérias mais comuns são inviáveis); simplicidade na obtenção de frações membranares puras (a bactéria possui uma única membrana a rodear o citoplasma), na extração de lípidos e no isolamento de protoplastos (por rotura da parede com lisozima), os quais, para além do mais, apresentam uma grande durabilidade (manutenção dos níveis de atividade enzimática durante dias), muito superior à de outras preparações biológicas equivalentes como frações mitocondriais.

A estas vantagens, podia contrapor-se uma limitação na utilização desta bactéria para avaliação de ecotoxicidade, já que se trata de um microrganismo que, pela sua natureza termofílica, se restringe a ambientes de temperatura superior a 45 °C. Não obstante, estudos levados a cabo no nosso laboratório com compostos organoestanhados (Martins, 2008) demonstraram que uma bactéria mesofílica do mesmo género, designadamente *Bacillus subtilis*, permite obter parâmetros de toxicidade relativa (toxicidade de uns compostos em relação a outros) muito semelhantes aos fornecidos por *Geobacillus stearothermophilus*.

Selecionados os modelos biológicos, impôs-se a necessidade de criar as condições que permitissem cancelar eventuais interferências nos ensaios de avaliação toxicológica, resultantes da natureza das suspensões de nanopartículas ensaiadas ou das técnicas utilizadas. Em relação às suspensões de nanopartículas, dois aspectos foram tomados em consideração: por um lado, a ausência completa de solventes nas suspensões aquosas de fulereno e, por outro lado, a estabilidade coloidal das mesmas. A suspensão das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ foi feita diretamente em água, não oferecendo qualquer tipo de risco de contaminação. No entanto, a preparação da suspensão aquosa de C_{60} necessitou de uma prévia solubilização do fulereno num solvente orgânico (tolueno). A utilização de tetra-hidrofurano foi rejeitada do nosso protocolo de preparação das suspensões aquosas de C_{60} por se ter conhecimento da literatura de que preparações nessas condições revelavam um nível de toxicidade em bactérias, dáfnias e peixes muito superior ao de suspensões preparadas sem recurso a esse solvente orgânico (Fortner et al., 2005; Lovern e Klaper, 2006; Zhu et al., 2006; Henry et al., 2007). Por outro lado, procedeu-se a uma microextração das suspensões aquosas de C_{60} em fase sólida, com análise dos compostos voláteis retidos na microfibra por cromatografia de gás associada a espectrometria de massa (ver secção de Material e Métodos), não tendo sido detetados vestígios de tolueno nas amostras analisadas. Dessa forma, ficou comprovado que o solvente, a existir ainda nas suspensões aquosas de C_{60} , teria uma concentração inferior a 0,1 ng/ml (limite inferior de deteção obtido a partir de uma curva de calibração com uma série de soluções de tolueno em água). No que diz respeito à estabilidade coloidal das preparações de C_{60} , ensaios de dispersão dinâmica de luz mostraram que as dimensões das nanopartículas, após diluição das respetivas suspensões aquosas nos meios de crescimento e nos meios de reação utilizados ao longo deste estudo (Tabela IV), não alteravam significativamente e eram mantidas ao longo de uma experiência de várias horas. Por outro lado, a carga superficial das nanopartículas (potencial Zeta) também não era afetada pela diluição das respetivas suspensões aquosas nos meios experimentais.

No que respeita à eventual interferência das condições experimentais na avaliação de toxicidade das nanopartículas, esta questão foi particularmente pertinente no caso da determinação do crescimento bacteriano por um método espectrofotométrico. Assim, em primeiro lugar, traçámos um espectro de absorvência das suspensões aquosas de nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ para nos certificarmos de que não absorviam luz ao comprimento de onda (610 nm) usado para as leituras de turbidimetria das suspensões de células bacterianas (pseudo-absorvência, devida à dispersão da luz pelas células em

suspensão). Em segundo lugar, preparámos para cada concentração de fulerenos ensaiada um controlo (suspensão das nanopartículas em meio de cultura), cuja D.O. a 610 nm foi seguida ao longo do crescimento das culturas bacterianas para ser descontada das leituras referentes às suspensões de bactérias, nas diversas condições de crescimento. É de realçar que os valores de D.O. nas suspensões de nanopartículas em meio de crescimento, na ausência de células, foram sempre muito baixos e mantinham-se estáveis ao longo da experiência de crescimento, denotando estabilidade coloidal das suspensões de fulereno quando submetidas às condições de crescimento das culturas bacterianas (incubador de banho termostaticado a 65 °C, com agitação em vaivém a 100 cursos por minuto).

Dos resultados obtidos no âmbito do trabalho a que diz respeito a secção 3.2 desta Dissertação, destacam-se os que revelaram, por parte de ambos os fulerenos ensaiados, ausência ou muito ligeira toxicidade no modelo bacteriano e toxicidade moderada na planta aquática *Lemna gibba*. Para que se pudesse constatar a adequação dos modelos usados neste trabalho a estudos de toxicidade, foram integrados em Material Suplementar (Anexos I e III) resultados obtidos em estudos conduzidos paralelamente com outros poluentes conhecidos, designadamente os herbicidas alacloro (da família das cloroacetanilidas) e linurão (uma fenil-ureia), para os quais havia referências na literatura de efeitos tóxicos em organismos não-alvo. É de realçar a versatilidade do modelo bacteriano (*Geobacillus stearothermophilus*) em termos dos parâmetros fornecidos para avaliação de toxicidade. Por um lado, as curvas de crescimento podem fornecer informação quantitativa do efeito inibitório, através da determinação de parâmetros como a duração da fase latente, a taxa específica de crescimento e a densidade de células em cultura no início da fase estacionária. Por outro lado, a velocidade de consumo de oxigénio por protoplastos, suportado por exemplo por NADH, permite quantificar a severidade do efeito tóxico e, eventualmente, relacioná-lo com o crescimento bacteriano, sugerindo uma base mecanística para a toxicidade, que, a nível molecular, se prende comumente com uma atividade membranar do composto em causa. Por outras palavras, um composto que partilha fortemente na membrana pode afetar as propriedades físicas da bicamada lipídica com eventual repercussão nas interações lípido-proteína e proteína-proteína, resultando inibição de funções associadas à membrana (por exemplo, a fosforilação oxidativa) e, conseqüentemente, inibição do crescimento das células. Estas relações têm sido estabelecidas com *Geobacillus stearothermophilus* para uma variedade de compostos, como se exemplifica nos anexos I e III desta dissertação, com os herbicidas alacloro e linurão. Estes herbicidas afetam o crescimento bacteriano a concentrações diferentes (Fig.

1, Anexo I), denotando o linurão uma toxicidade superior ao alacloro, consistentemente com os resultados obtidos em estudos de respiração mitocondrial (Fig. 2, Anexo III). Por outro lado, o mesmo herbicida (no caso exemplificado, o linurão) apresenta toxicidade nos modelos bacteriano e mitocondrial na mesma gama de concentrações, o que confere solidez e fiabilidade aos dados toxicológicos obtidos com estes ensaios *in vitro*. É de realçar que muito embora os complexos respiratórios das bactérias, nomeadamente de *Geobacillus stearothermophilus*, sejam estruturalmente mais simples do que os complexos homólogos da mitocôndria, partilham muitas características comuns e são funcionalmente equivalentes. Assim, a transferência de eletrões até ao oxigénio molecular, associada à translocação de protões através da membrana celular, ocorre ao longo dos complexos respiratórios bacterianos residentes na membrana plasmática que, de forma semelhante aos da mitocôndria, se associam em supercomplexos cuja estabilidade parece depender estreitamente de interações com lípidos (Zhang et al., 2002; Pfeiffer et al., 2003). O sistema respiratório de *Geobacillus stearothermophilus* é constituído por complexos proteicos que desenvolvem uma atividade bastante semelhante aos complexos existentes nas mitocôndrias (Pereira et al., 2004), designadamente: desidrogenase de NADH que pode ser de dois tipos: desidrogenase sensível a rotenona (NDH-1) com semelhanças significativas ao Complexo I mitocondrial, mas também diferenças em algumas subunidades e com dador de eletrões desconhecido, e NADH desidrogenase alternativa (NDH-2) insensível a rotenona e que utiliza NADH como substrato respiratório; succinato:menaquinona oxidoreductase ou Complexo II; Complexo b_6c_1 ou Complexo III, responsável por oxidar menaquinol e reduzir citocromo c; redutase de oxigénio ou Complexo IV que pode ser do tipo caa_3 (expresso em condições normais de oxigénio) como do tipo $b(o/a)_3$ (com um papel importante em condições de baixa concentração de oxigénio), sendo o transporte entre o complexo III e a redutase de oxigénio conduzido, como na mitocôndria, por citocromo c. Uma característica particular dos sistemas respiratórios de bactérias é a sua versatilidade, em resultado de combinações ou ramificações na cadeia de transporte de eletrões, conjugando complexos enzimáticos com diferentes afinidades por substratos e diferentes velocidades de catálise. Esta peculiaridade, que parece constituir uma forma eficaz de adaptação das bactérias às condições do meio, pode ser evocada para explicar que as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ não tenham prejudicado o desenvolvimento das culturas de *G. stearothermophilus* a concentrações às quais terão produzido dano considerável na atividade respiratória dos protoplastos suportada por NADH.

Ainda com respeito às culturas de *Geobacillus stearothermophilus* não terem sido afetadas ou terem sido muito pouco afetadas pela presença das nanopartículas de fulereno, é de salientar que estes resultados se, por um lado, são consistentes com os reportados por outros autores em relação a outros microrganismos, como *Escherichia coli* e *Shewanella oneidensis* (Tang et al., 2007), estão, todavia, em desacordo com outros estudos que descrevem um impacto negativo dos fulerenos, nomeadamente C₆₀, em *E. coli* (Aquino et al., 2010), bem como em outros microrganismos (Johansen et al., 2008) e organismos mais complexos como *Daphnia magna* e peixes (Lovern e Klaper, 2006; Zhu et al., 2006; Usenko et al., 2007). Esta disparidade de efeitos exercidos pelo C₆₀, inclusivamente num mesmo organismo (caso de *E. coli*), pode dever-se a vários fatores, entre os quais se contam a qualidade das próprias preparações de fulereno em água e a sua eventual contaminação com solventes orgânicos, como o tetra-hidrofurano. De facto, suspensões aquosas de C₆₀ em cujo protocolo de preparação foi incluído este solvente revelaram-se mais tóxicas para as bactérias do que as preparadas com outros solventes, como por exemplo o tolueno (Lyon et al., 2006). No estudo de Aquino e colaboradores (2010), por exemplo, que refere um efeito inibitório das nanopartículas de C₆₀ no crescimento de *E. coli*, foi utilizado tetra-hidrofurano no protocolo de preparação das suspensões aquosas daquele fulereno.

Os estudos efetuados com *Lemna gibba* vieram, por outro lado, reforçar a ideia de que a luz constitui um fator essencial a ser tomado em consideração quando se pretende compreender e prever a atividade biológica dos fulerenos. Consistentemente, foi descrito que nanopartículas de C₆₀ promovem peroxidação lipídica em tecido de cérebro de carpa, *cyprinus carpio*, de C₆₀, mas apenas na presença de luz artificial (Shinohara et al., 2008).

De facto, a fotoativação de C₆₀ na presença de oxigénio pode conduzir à formação de ROS (Prat et al., 1999; Hirsch e Brettreich, 2005), cujas interações com alvos biológicos têm sido evocadas para explicar efeitos adversos de nanopartículas daquele fulereno (Oberdörster, 2004; Usenko et al., 2008). Efetivamente, reações de ROS com moléculas biológicas (proteínas, ácidos nucleicos e lípidos) podem causar danos (aductos de proteínas e de DNA e peroxidação lipídica) que, a não serem reparados, conduzem à morte das células (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Se é certo que a toxicidade de C₆₀, particularmente sob radiação luminosa, tem sido associada às suas propriedades pró-oxidantes, também é verdade que grande controvérsia continua a subsistir em relação ao verdadeiro causador dos efeitos oxidativos observados na presença de suspensões aquosas de C₆₀, isto é, se são as próprias nanopartículas de

fulereno ou os resquícios de solvente orgânico (sobretudo tetra-hidrofurano) existentes nessas suspensões os responsáveis diretos pelo stresse oxidativo. Uma vez que não se recorreu a tetra-hidrofurano para a preparação das suspensões aquosas de C_{60} utilizadas neste trabalho e o tolueno, usado no seu lugar para dissolver o fulereno (ver secção de Material e Métodos), não foi detetado nas amostras analisadas por GC/MS, como referido atrás, podemos concluir que, a ter ocorrido a geração de um excesso de ROS durante o desenvolvimento de *Lemna gibba* na presença de nanopartículas de C_{60} , ele deve ter decorrido da fotoativação das moléculas de fulereno ou então de um decréscimo das defesas antioxidantes da planta aquática.

Outro aspeto a realçar destes estudos diz respeito à diminuição do conteúdo em clorofilas nas plantas expostas aos fulerenos que, no caso das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$, ocorreu na ausência de perturbações no crescimento da *Lemna gibba*. No entanto, a avaliação da velocidade de produção de oxigénio, como parâmetro revelador da atividade dos cloroplastos, permitiu estabelecer uma boa correlação entre os efeitos dos fulerenos na proliferação vegetativa da planta e no estado funcional dos cloroplastos, estreitamente dependente do conteúdo em clorofilas, mas também de outros fatores como a estrutura da membrana dos tilacoides.

No entanto, não deve ser excluída a hipótese de C_{60} ter promovido toxicidade em *Lemna gibba* por processos não relacionados diretamente com o sistema fotossintético da planta. Assim, a inibição do crescimento da *Lemna gibba* pode ter ficado a dever-se a uma redução de nutrientes disponíveis à planta, por aprisionamento inespecífico ou de determinado tipo de moléculas requeridas ao desenvolvimento vegetal pelas nanopartículas de C_{60} . De facto, fenómenos de adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas às nanopartículas de C_{60} têm sido reportados na literatura (Johansen et al., 2008). Atendendo a que as moléculas daquele fulereno podem formar agregados com uma estrutura cúbica (descrita por estrutura cúbica de faces centradas), os espaços criados entre as moléculas podem previsivelmente ser ocupados por átomos/iões ou pequenas moléculas de natureza diversa, cuja adsorção às nanopartículas de C_{60} poderá ser regida por aspetos de compatibilidade geométrica ou outras características que determinem a afinidade das moléculas adsorvidas pelas moléculas de C_{60} . Consistentemente, a redução dos recursos nutritivos em comunidades de microrganismos do solo, após incorporação de C_{60} , foi evocada por alguns autores para explicar a inibição do crescimento de bactérias (Johansen et al., 2008).

No seu conjunto, os resultados obtidos na secção 3.2 mostram que as nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ exercem efeitos tóxicos severos em *Lemna gibba*, mas têm uma ação muito ténue ou nula no metabolismo e no crescimento de *Geobacillus stearothermophilus*. Ao nível do crescimento, tanto do microrganismo como da planta, as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ não mostram toxicidade a concentrações uma ordem de grandeza superiores àquelas a que as nanopartículas de C_{60} revelam toxicidade moderada (no caso do microrganismo) ou notória (no caso da planta). Tal facto, vem ao encontro dos estudos efetuados em membranas e mitocôndrias (secção 3.1), reveladores de que a natureza química da superfície das nanopartículas, incluindo a sua carga superficial (potencial Zeta das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ é mais negativo do que o das nanopartículas de C_{60} em todos os meios ensaiados) pode influenciar a sua atividade biológica. Este comportamento diferencial entre C_{60} e seus derivados na interação com sistemas biológicos foi consistentemente reportado por outros investigadores em estudos realizados com microrganismos (Kubatova et al., 2013), células animais (Sayes et al., 2004) e peixes (Usenko et al., 2007).

Por outro lado, tendo em consideração que os organismos utilizados neste estudo (procariótico e eucariótico) possuíam ambas paredes celulares, embora de diversa natureza (de peptidoglicano, a bacteriana e de celulose, a da planta), é lícito reservar um espaço de debate para a possibilidade de os diferentes efeitos dos fulerenos na proliferação desses organismos se prenderem com uma menor acessibilidade do composto hidroxilado ao interior da célula. Uma interação preferencial das nanopartículas ornadas de grupos hidroxílicos com elementos dessas paredes impedi-las-ia de atingirem a célula na concentração prevista.

É de salientar que os resultados deste trabalho dão solidez à hipótese, previamente formulada, de que o metabolismo dos organismos fotossintéticos, dependente de luz, lhes confere particular suscetibilidade à toxicidade das nanopartículas de C_{60} . Assim, quando C_{60} é libertado no ambiente e ativado pela luz, a geração de ROS pode colocar em perigo todos os seres vivos nas suas imediações, mas os danos serão previsivelmente maiores para os organismos que requerem maior exposição solar (fotossintéticos). Sendo estes organismos (produtores de matéria orgânica) essenciais num ecossistema, para assegurar a viabilidade dos elementos da cadeia alimentar de níveis tróficos superiores, um desequilíbrio ecológico pode advir da acumulação daquele fulereno na Natureza, com previsível prejuízo ambiental. Torna-se, assim, evidente a premência em desenvolver mais estudos no sentido de investigar o destino dos fulerenos libertados no ambiente, a partir de

uma multiplicidade de produtos comerciais em cuja formulação se incluem, para que se tomem medidas que regulamentem o destino final dos produtos que contêm estes compostos.

Em virtude dos fulerenos estudados no âmbito deste trabalho de tese terem manifestado níveis baixos de toxicidade nos sistemas biológicos a que se reportam os resultados obtidos nas secções 3.1 e 3.2, a investigação do seu eventual potencial terapêutico surgiu no horizonte deste trabalho como uma nova etapa de particular relevância, justificando o subtítulo desta tese. Neste contexto, foi avaliada a toxicidade das nanopartículas de C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ em várias linhas celulares, nomeadamente células HeLa, neuro2a e astrócitos de rato. A ausência de efeitos adversos nas referidas células ao fim de 24 e 48 horas de incubação com as nanopartículas nas concentrações de 5 a 15 mg/L para C_{60} e de 5 a 100 mg/L para $C_{60}(OH)_{18-22}$ veio corroborar resultados reportados na literatura com outros tipos de células, nomeadamente macrófagos provenientes de monócitos humanos (Porter et al., 2006) expostos às nanopartículas de C_{60} (até 10 mg/L) durante 48 h. Todavia, outros investigadores demonstraram que as nanopartículas de C_{60} são tóxicas para fibroblastos de derme humana e células de hepatocarcinoma humano (HepG2), toxicidade não manifestada, porém, pelas nanopartículas de $C_{60}(OH)_{24}$ nas mesmas células (Sayes et al., 2004). De acordo com Su e colaboradores (2010), a citotoxicidade das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{22-24}$ varia com a linha celular utilizada.

Perante a ausência de efeitos tóxicos dos fulerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ nas células ensaiadas no presente trabalho, incluindo células neuro2a e culturas primárias de astrócitos de rato, e de forma a investigar o potencial destes compostos no tratamento de doenças neurodegenerativas, foram encetados estudos com vista a avaliar o efeito protetor dos fulerenos numa situação de stress oxidativo. Com efeito, doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson (Behl, 1999), embora de etiologia ainda mal esclarecida, têm sido fortemente relacionadas com desequilíbrios no estado oxido-redutor da célula. São várias as razões que têm vindo a ser evocadas para explicar a particular suscetibilidade das células nervosas a stresse oxidativo. Por um lado, estas células, comparativamente com outras de diferente proveniência, não são munidas de um grande arsenal de defesas antioxidantes, sendo a sua atividade antioxidante 10% inferior à das células do fígado, por exemplo (Uttara et al., 2009). Por outro lado, as células nervosas apresentam uma proporção elevada de ácidos gordos polinsaturados nos seus lípidos membranares, o que as torna particularmente suscetíveis a danos oxidativos, já que espécies reativas de oxigénio poderão facilmente desencadear peroxidação lipídica. Assim,

as propriedades antioxidantes de uma diversidade de compostos químicos têm sido estudadas no sentido de desenvolver estratégias terapêuticas aplicáveis na prevenção e/ou tratamento das doenças neurodegenerativas.

Foi neste contexto que se desenvolveram os estudos com os fulerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ reportados na secção 3.3 do presente trabalho. Assim, de forma a avaliar o potencial das nanopartículas prevenirem ou combaterem eficientemente uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio nas células nervosas, recorreu-se a um agente pro-oxidante conhecido (*t*-butil-hidroperóxido) com o qual as células (neuro2a) foram incubadas em duas situações distintas: a) após tratamento com as nanopartículas de fulereno (a fim de avaliar a eficiência das nanopartículas numa estratégia de prevenção da toxicidade) ou b) em simultâneo com as nanopartículas (para avaliar a capacidade das nanopartículas para suprimirem os efeitos tóxicos do indutor de stresse oxidativo).

Ficou bem patente que as nanopartículas de C_{60} protegem as células neuro2a contra a ação do *t*-butil-hidroperóxido (composto oxidante capaz de atravessar as membranas e de induzir morte celular por apoptose ou necrose), contrariando o seu efeito tóxico nestas células de uma forma ainda mais eficaz (à concentração de 5 mg/L) do que o conhecido agente antioxidante trolox a uma concentração 15x superior. Adicionalmente, demonstrou-se que as nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$, ao contrário das nanopartículas de C_{60} , não oferecem qualquer tipo de proteção às células neuro2a contra o efeito deletério de *t*-butil-hidroperóxido, reforçando resultados anteriores reveladores da importância da química superficial das nanopartículas na sua atividade biológica. A diferente eficiência dos fulerenos C_{60} e $C_{60}(OH)_{18-22}$ como antioxidantes poderia estar relacionada com propriedades moleculares das nanopartículas, nomeadamente no que respeita à afinidade das moléculas por eletrões. De facto, esta é uma característica intrínseca aos fulerenos, mas é fortemente influenciada pela química superficial da molécula, ou, por outras palavras, pela existência ou ausência de grupos funcionais e respetiva composição química (Yin et al., 2009). A reatividade química da molécula de C_{60} deve-se às suas 30 duplas ligações carbono-carbono que, segundo alguns autores, podem reagir com mais de 34 radicais metilo (Krusic et al., 1991). A funcionalização de C_{60} diminui, dessa forma, a sua reatividade. Contudo, este está longe de ser o único fator determinante da capacidade dos fulerenos para protegerem os sistemas biológicos de stresse oxidativo (Wang et al., 1999). Nesta perspetiva, é de assinalar que, nas experiências de peroxidação lipídica induzida por *t*-butil-hidroperóxido em membranas mitocondriais isoladas (Fig. 26), ambos os fulerenos revelaram uma significativa capacidade de proteção dos lípidos contra o dano oxidativo

(manifestada pela oposição ao decréscimo de fluorescência do ácido cis-parinárico). Consistentemente, os estudos de Wang e colaboradores (1999) mostraram que tanto o fulereno C_{60} (lipofílico) como derivados de C_{60} solúveis em água se opunham à peroxidação lipídica induzida por radicais hidroxilo e superóxido. Estes autores chamaram igualmente a atenção para a importância da localização das moléculas de antioxidante na membrana para a eficiência das mesmas em contrariar a peroxidação lipídica. A oxidação dos lípidos membranares pode, efetivamente, ser combatida de duas formas diferentes: por supressão dos radicais iniciadores do processo e por interrupção das suas reações de propagação. A peroxidação lipídica é, porém, mais eficientemente retardada pela “quebra” do processo de propagação do que por supressão do agente que o iniciou. Neste contexto, moléculas mais hidrofílicas, que permanecem na fase aquosa (como é o caso de trolox, usado nas experiências com células como antioxidante de referência) ou que apenas parcialmente ou superficialmente se inserem na membrana (como é o caso do fulereno $C_{60}(OH)_{18-22}$) deverão ser menos eficientes na proteção contra a peroxidação lipídica do que moléculas que se inserem no interior da membrana como o C_{60} e, dessa forma, acedem com maior facilidade à região da bicamada lipídica afetada pela propagação dos danos oxidativos (região das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos com duplas ligações e prótons alílicos reativos).

Transportando-nos de novo para as experiências em células, a incapacidade do fulereno hidroxilado para proteger as células do stresse oxidativo causado por *t*-butil-hidroperóxido deve, assim, ser explicada tomando em consideração outros fatores, para além da sua reatividade com radicais. Em primeiro lugar, atenção deve ser dada à forma como o agente oxidante interage com as células: *t*-butil-hidroperóxido consegue permear a membrana e, uma vez dentro da célula, gera radicais *t*-butoxi através de reações dependentes de ferro semelhantes às reações de Fenton. Estes radicais promovem peroxidação lipídica, podem modificar os grupos tiol de proteínas e contribuir para o esgotamento de glutatião intracelular. A perda de viabilidade celular é a consequência que decorre destes efeitos e que pode resultar em apoptose (para concentrações baixas de *t*-butil-hidroperóxido) ou em necrose (para concentrações elevadas do oxidante). Vários estudos apontam para o processo de apoptose promovido por *t*-butil-hidroperóxido estar associado à abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial com despolarização da mitocôndria, rotura da membrana mitocondrial externa, libertação do citocromo *c* para o citosol e consequente ativação da caspase-9 (Piret et al., 2004; Zhao et al., 2005). A mitocôndria tem, assim, um papel central na toxicidade causada por aquele

agente pro-oxidante. Desta forma, a acessibilidade dos antioxidantes ao interior da célula e a sua afinidade pela mitocôndria são aspetos a serem levados em conta na interpretação dos seus efeitos protetores contra a ação oxidativa de *t*-butil-hidroperóxido. Consistentemente, Zhao e colaboradores (2005) mostraram que o peptídeo SS-31, que se acumula preferencialmente na mitocôndria, protege as células neuro2a dos efeitos deletérios de *t*-butil-hidroperóxido, na concentração de 25 a 50 μM , diminuindo a morte celular por apoptose.

Neste contexto, é interessante a proposta de Qiao et al (2007), com base em estudos de simulação, segundo a qual as moléculas de C_{60} abrem caminho na bicamada através da formação de pequenas cavidades onde se introduzem favoravelmente devido a interações hidrofóbicas, podendo depois atravessar a membrana por difusão e sendo libertadas do outro lado da membrana devido ao gradiente de concentração. Já as moléculas de fulereno hidroxilado (no caso deste estudo $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$) seriam adsorvidas à superfície da membrana sem a permear. A interação com os grupos polares dos fosfolípidos conduziria a um aumento de compactação molecular, que impediria que as moléculas de fulereno penetrassem na membrana. O tempo de translocação seria por isso para $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$ nove ordens de grandeza superior ao do fulereno lipofílico C_{60} . Assim, transpondo estes resultados para as células, seria de esperar que as nanopartículas de C_{60} se distribuíssem dentro da célula, eventualmente ao nível da mitocôndria como já foi proposto para alguns fulerenos (Foley et al., 2002), muito mais eficazmente do que as do fulereno hidroxilado.

A importância da mitocôndria em situações de stresse oxidativo decorre do facto de o sistema respiratório mitocondrial ser o principal local onde ocorre a produção de ROS dentro da célula (Boelsterli, 2007). O anião superóxido é um produto colateral da atividade respiratória normal da mitocôndria, resultando da redução de oxigénio por um único eletrão. O anião superóxido, embora não seja das espécies de oxigénio mais reativas, pode conduzir a danos ao nível das enzimas com centros ferro-enxofre, como a aconitase, e, por outro lado, pode dar origem a espécies moleculares mais reativas, como peroxinitrito (por reação com óxido nítrico) e radical hidroxilo, formado a partir de peróxido de hidrogénio (na presença de iões ferro e cobre) no qual o anião superóxido é convertido numa reação catalizada por superóxido dismutase mitocondrial (contendo manganésio). Desta forma, fatores que conduzam a uma geração exagerada de anião superóxido na mitocôndria ou promovam uma redução das suas defesas antioxidantes podem causar, de forma direta ou indireta, danos importantes naquele organelo. Todas as moléculas biológicas podem ser alvo das espécies reativas formadas na mitocôndria, nomeadamente o DNA (DNA

mitocondrial sendo mais suscetível a dano oxidativo do que o ADN nuclear por não possuir histonas), as proteínas e os lípidos. Se o dano oxidativo não for seguido de reparação, a síntese de ATP, a homeostase do cálcio e a condutância fisiológica do poro de permeabilidade transitória podem ficar comprometidas e as células podem sofrer apoptose ou, em casos em que as reservas de ATP ficam reduzidas, necrose. A principal fonte de anião superóxido na mitocôndria *in vivo* parece ser o Complexo I, mais precisamente o grupo de flavina-mononucleótido (FMN) do complexo I (Liu et al., 2002). A geração de superóxido a partir de ubiquinol ocorreria quando o gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$) era suficientemente elevado para conduzir o transporte reverso de eletrões em mitocôndrias intactas (Liu et al., 2002; Green et al., 2004). Nestas condições, o anião superóxido seria produzido do lado da matriz da membrana interna da mitocôndria, sendo a sua geração inibida por rotenona ou por ação de um dissociador da fosforilação oxidativa (St-Pierre et al., 2002). De facto, a ideia que vigorou durante muito tempo de que a produção de ROS na mitocôndria era favorecida por um aumento da velocidade de consumo de oxigénio é hoje em dia pouco aceite. Em contraste, considera-se atualmente que altos níveis de redução dos transportadores de eletrões do sistema respiratório mitocondrial, particularmente de coenzima Q, e um elevado $\Delta\mu_{H^+}$ propiciam a produção de superóxido ao nível do complexo I, por ser potenciado, nessas condições, o transporte de eletrões em sentido reverso (Green et al., 2004). Desta forma, o processo de síntese de ATP (durante a respiração em estado 3) opõe-se à produção de superóxido, porque conduz a um decréscimo de $\Delta\mu_{H^+}$, aumento da oxidação dos transportadores de eletrões e redução da concentração de oxigénio. Por outro lado, uma vez que a geração de superóxido é propiciada por valores elevados de $\Delta\mu_{H^+}$, é previsível que agentes que se oponham à formação desse gradiente contrariem a formação de superóxido. Consistentemente, foi demonstrado que concentrações baixas de dissociadores do processo de fosforilação oxidativa reduzem a taxa de produção de superóxido nas mitocôndrias (Green et al., 2004).

Reportando-nos aos estudos de bioenergética mitocondrial efetuados neste trabalho (secção 3.1), é interessante notar que as nanopartículas de C_{60} , ao invés das de $C_{60}(OH)_{18-22}$, estimulam a respiração em estado 4 suportada por glutamato/malato (Complexo I), promovendo um decréscimo do índice de controlo respiratório (ICR), o que traduz uma certa dissociação do processo de fosforilação oxidativa, situação que, de acordo com o que foi explicado atrás, constituiria um entrave à produção de ROS.

Outra questão prende-se com a ação das nanopartículas de C_{60} na prevenção da morte das células induzida por *t*-butil-hidroperóxido. A admitir-se que a morte na presença

deste composto se relaciona estreitamente com a sua atividade pro-oxidante, as nanopartículas de fulereno teriam mostrado não só a capacidade de interromper o processo oxidativo conduzido por *t*-butil-hidroperóxido (na situação em que são adicionadas às células em simultâneo com o agente oxidante) como em prevenir o stresse oxidativo induzido por aquele agente oxidante (na situação em que são adicionadas antes do estímulo oxidativo). Neste último caso, não é de excluir um efeito das nanopartículas nas defesas antioxidantes da célula. Efetivamente, é conhecido que *t*-butil-hidroperóxido promove um significativo decréscimo de glutatião (Alía et al., 2005), uma das defesas antioxidantes não enzimáticas mais importantes da célula, que existe não só no citoplasma, como na mitocôndria e no núcleo (Boelsterli, 2007). Glutatião reduzido (GSH) é responsável por suprimir radicais e constitui uma reserva de grupos sulfidrilo que assegura a redução de pontes dissulfeto em proteínas, participando na regeneração de proteínas oxidadas. Por outro lado, com a participação da glutathione-peroxidase, GSH promove (como co-substrato) a degradação de H₂O₂ e de peróxidos lipídicos. Prylutska e colaboradores (2008), demonstraram que as nanopartículas de C₆₀ adicionadas a timócitos, antes da incubação com H₂O₂ (indutor de stresse oxidativo, responsável por um decréscimo de GSH e da viabilidade celular), protegiam eficientemente as células, assegurando a viabilidade das culturas a valores semelhantes aos do controlo (cultura de células sem tratamento) e contrariando a diminuição dos níveis de GSH. Atendendo a um estudo realizado em fibroblastos em que a distribuição intracelular de um derivado de fulereno C₆₀ foi investigada, demonstrando-se a sua preferência pela mitocôndria (Foley et al., 2002) e, por outro lado, ao papel crítico que GSH desempenha na mitocôndria, é de admitir que, no presente trabalho, as nanopartículas de C₆₀ tenham prevenido a morte das células neuro2a induzida por *t*-butil-hidroperóxido, equipando a mitocôndria de um arsenal aumentado de defesas antioxidantes, entre as quais GSH. Sayes e colaboradores (2005) menciona um aumento significativo de GSH em vários tipos de células, induzido por C₆₀, que atribui, porém, a uma resposta celular à toxicidade das nanopartículas. Uma possibilidade interessante seria considerar que as nanopartículas têm a capacidade de promover esse aumento de GSH (e eventualmente de outros agentes antioxidantes) devido a uma formação muito restrita de espécies reativas de oxigénio após foto-excitação (Yamakoshi et al., 2003; Markovic e Trajkovic, 2008), sem contudo comprometer a viabilidade celular. Tal facto constituiria uma proteção para as células contra os efeitos deletérios de *t*-butil-hidroperóxido, se a ele fossem posteriormente expostas.

Numa perspetiva terapêutica direcionada para doenças neurodegenerativas, surgiu como um desafio interessante, no âmbito deste trabalho, conjugar a capacidade revelada pelas nanopartículas de C₆₀ de protegerem as células nervosas contra um estímulo oxidativo à entrega de material genético, num contexto de terapia génica. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm consolidado a convicção de que existe uma forte relação entre a morte das células nervosas em patologias neurodegenerativas (*e.g.* doença de Alzheimer), o stresse oxidativo e distúrbios na função mitocondrial. Provavelmente esta relação envolve uma rede intrincada de efeitos e o cruzamento de vias de sinalização com participação de vários organelos como núcleo, lisossomas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi na libertação de sinais de morte que convergem na mitocôndria como uma central de decisão e execução dos destinos da célula (Ferri e Kroemer, 2001). Nesta perspetiva, são vários os produtos de genes que, estando envolvidos na morte da célula ou na sua sobrevivência, aparecem como alvos adequados a uma intervenção terapêutica em doenças neurodegenerativas. Assim, a expressão de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-XL, ou ligados às vias de sobrevivência, como Akt (cinase serina/treonina), e o silenciamento de genes pro-apoptóticos, como BAD e caspase-9, poderiam constituir o objetivo de uma estratégia de neuroprotecção. Ao nível da mitocôndria, Bcl-2 promove a libertação de mediadores de sobrevivência que estabilizam o potencial da membrana mitocondrial (Dispersyn et al., 1999), contrariam o esgotamento de ATP (Kim et al., 2001) e a peroxidação lipídica induzida por stresse oxidativo (Howard et al., 2002). Adicionalmente, Bcl-2 promove o crescimento axonal e a sua regeneração (Chen et al., 1997; Holm e Isacson, 1999) e atenua a geração de espécies reativas de oxigénio (Bogdanov et al., 1999). Por outro lado, a ativação de Akt determina não só a fosforilação e conseqüente inibição de vários mediadores da apoptose como BAD, caspase 9 e I κ B cinase, como também promove um aumento da expressão de Bcl-2 (Finkbeiner, 2000; Pugazhenthil et al., 2000), ao contrário de Nip-2 (gene pró-apoptótico), um regulador negativo de Bcl-2 nos neurónios (Brusadelli et al., 2000) que surge, assim, como um alvo de silenciamento no âmbito da neuroprotecção.

Foi neste contexto que se encetaram estudos para avaliação da capacidade das nanopartículas de C₆₀ promoverem a entrega intracelular de ácidos nucleicos. De acordo com as considerações tecidas acima, duas possibilidades se revelavam igualmente válidas para promover neuroprotecção por regulação génica: induzir a sobre-expressão de genes que garantissem a sobrevivência das células neuronais ou silenciar genes que induzissem a sua morte. Se para a primeira estratégia se impunha a utilização de plasmídeos de DNA

munidos dos genes envolvidos na neuroproteção, para a segunda necessitava-se de RNAs de interferência (siRNA) que promovessem o silenciamento de genes indesejáveis. Ambas as estratégias foram desenvolvidas numa fase preliminar, isto é, com ensaios em que se utilizaram “genes-repórter”, de cuja expressão resultava como produto a proteína GFP. O insucesso na transfecção com a utilização das nanopartículas de C₆₀ como elemento único de complexação dos ácidos nucleicos não surpreendeu. As nanopartículas revelavam uma carga negativa superficial que se previa que constituísse, por si, um entrave à complexação com as moléculas de ácidos nucleicos, elas também possuidoras de uma alta densidade de carga negativa. Dessa forma, recorreu-se a diversos componentes coadjuvantes na complexação dos ácidos nucleicos que atuassem como auxiliares da transfecção. Entre esses componentes, experimentaram-se peptídeos, surfactantes gemini e vários lípidos. No presente trabalho, mostram-se os resultados obtidos com uma mistura clássica de lípidos: DOTAP e DOPE.

Os componentes de vetores não-virais são selecionados tendo em vista as seguintes características: a) capacidade de condensação do material genético, conferindo-lhe proteção contra a ação das nucleases; b) reconhecimento das células-alvo; c) eficiência da libertação do material transportado no espaço intracelular ou, no caso de DNA, no núcleo. No caso de vetores em cuja composição são utilizados lípidos, tem-se observado que a eficiência do processo de expressão genética é influenciada por: d) comprimento e saturação das cadeias de ácidos gordos do lípido; e) natureza do grupo polar e distanciamento entre a região com carga e a parte hidrofóbica e iii) densidade e número de cargas por molécula (Chesnoy e Huang, 2000; Koynova et al., 2009). Em geral, a eficiência de transfecção com vetores constituídos por lípidos catiónicos diminui com o aumento do comprimento e saturação das cadeias hidrocarbonadas. Os lípidos catiónicos com ligações éter, DOTMA (N-(2,3-dioleoiloxipropilo)-N,N,N- cloreto de trimetilamónio) e DMRIE (Cloreto de N-(hidroxietil)-N-(2,3-ditetradeciloxipropanol)N, N-dimetilamónio), são mais tóxicos do que os que contêm ligações éster, como DOTAP, dada a diferença de estabilidade e biodegradabilidade dos lípidos (Simões et al., 2005). Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que a adição de DOPE a lípidos catiónicos (DOTMA ou DOTAP), em misturas equimolares, dá lugar a sistemas de entrega de DNA mais eficientes do que os que são obtidos com a adição de DOPC (1,2 – dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina), embora este seja também um lípido zwitteriónico e insaturado (Hui et al., 1996; Mok e Cullis, 1997). Este facto está relacionado com a capacidade do DOPE formar estruturas não lamelares, promovendo instabilidade na membrana endossomal e, dessa forma, favorecendo a

libertação do DNA para o citoplasma, como referimos anteriormente (Noguchi et al., 1998). Adicionalmente, a proporção de lípido catiónico e DNA, que determina o tamanho, a carga superficial, a eficiência da complexação e a estabilidade do lipoplexo, afeta determinantemente o processo de transfecção (Song et al., 1997).

Todos estes dados governaram a escolha dos elementos das formulações utilizadas neste trabalho. Se é certo que, nos ensaios com RNA de interferência, os resultados foram satisfatórios com as formulações selecionadas, já nos ensaios com plasmídeo (DNA), outras formulações deveriam ter sido testadas, nomeadamente com outras razões de carga, tendo em conta as considerações referidas atrás.

Uma estratégia que tem vindo a suscitar grande interesse na terapia génica diz respeito à utilização da via do RNA de interferência, que se baseia na degradação de um RNA mensageiro específico, no citoplasma, por pequenas moléculas de RNA de dupla cadeia (siRNA) que apresentam complementaridade em relação a uma sequência do mRNA-alvo (ver Capítulo 1, Introdução). Duas vantagens merecem destaque na estratégia de silenciamento relativamente àquela que envolve a inserção de um gene na célula, através da entrega de um plasmídeo. Em primeiro lugar, o material genético só precisa de ser entregue no citoplasma, eximindo-se à entrada no núcleo, constituindo esta última um obstáculo importante ao sucesso de transfecção, particularmente em células em que a divisão celular é lenta ou é rara. Por outro lado, as moléculas de siRNA são bem mais pequenas do que as de DNA, pelo que os seus requisitos de compactação são muito menos exigentes. É previsível mesmo que a pequena molécula de siRNA não altere significativamente a sua estrutura após interação com os grupos polares do lípido catiónico da formulação. Com alguns vetores, esse facto é responsável por alguma instabilidade do complexo, expondo o ácido nucleico a eventual degradação por macromoléculas biológicas do meio extracelular. No caso da formulação $C_{60}(\text{DOTAP:DOPE})/\text{siRNA}$ preparada na razão molar $C_{60}:(\text{DOTAP}+\text{DOPE})$ de 1:5 e na razão de carga (+/-) de 1/1,5, utilizada neste trabalho em células HT-1080, é de realçar que, apesar da baixa relação de carga, os complexos mostraram ser eficientes na entrega de siRNA no citoplasma da célula, promovendo significativos níveis de silenciamento do gene-repórter (de GFP). O recurso a uma baixa razão de carga (+/-) em experiências de silenciamento é muito importante, já que há referências na literatura de silenciamento não-específico induzido por lípidos catiónicos em vários tipos de células (Ma et al., 2005; Yoo et al., 2006). A este propósito, é de realçar que a formulação $C_{60}(\text{DOTAP:DOPE})/\text{siRNA}$ mencionada atrás, utilizada em células HT-1080, e a formulação $C_{60}(\text{DOTAP:DOPE})/\text{siRNA}$ preparada na razão molar

C₆₀:(DOTAP+DOPE) de 1:5 e na razão de carga (+/-) de 6/1, utilizada em células U87, mostraram assinalável especificidade no silenciamento promovido no gene para GFP, significativamente superior à revelada pela formulação lipossômica desprovida de C₆₀.

Em suma, os resultados obtidos na secção 3.3 fazem antever um significativo potencial terapêutico das nanopartículas de C₆₀, abrindo caminho para novas experiências em condições de maior proximidade à situação patológica real, por exemplo utilizando, como alvos, genes cujo silenciamento se preveja de interesse farmacológico. Considerando a baixa toxicidade demonstrada pelos complexos ensaiados e pelas nanopartículas isoladas e a capacidade destas em compensar os danos celulares causados por estímulos oxidativos, parecem ser boas as perspectivas de aplicação deste fulereno em doenças de foro neurológico.

Capítulo 5

Conclusões

O desenvolvimento da nanotecnologia promoveu, nos últimos anos, a expansão comercial de uma grande diversidade de nanomateriais, incluindo fulerenos, fazendo recrudescer as preocupações relativas a uma eventual contaminação ambiental e ao seu potencial impacto na saúde humana. A enorme diversidade de nanopartículas de fulereno com diferentes propriedades físico-químicas (*e.g.* forma, tamanho, química e carga de superfície), que têm vindo a ser sintetizadas com base na funcionalização do fulereno original (C₆₀), permite antever uma multiplicidade de interações com os sistemas biológicos com repercussão tanto a nível toxicodinâmico como toxicocinético. Assim, um estudo exaustivo com vista ao estabelecimento de relações estrutura-atividade surge como prioritário. O conhecimento que emerge deste tipo de estudos é fundamental não só para que se possa efetuar uma análise do risco dos fulerenos para o ambiente e para a saúde humana, mas também como diretriz a futuras conceções de moléculas que preservem as características benéficas aos fins a que se propõem, suprimindo as indesejáveis. Foi neste contexto que o presente trabalho se inseriu e se desenvolveu, sendo guiado por objetivos que se enquadram numa vertente de interesse fundamental e noutra de carácter mais aplicado.

Dos estudos realizados, destacamos as seguintes conclusões:

1. O protocolo desenvolvido para a preparação de suspensões aquosas de C₆₀ permitiu estabelecer uma metodologia robusta e eficaz de obter nanopartículas daquele fulereno num veículo aquoso desprovido de solventes orgânicos residuais, conferindo grande estabilidade coloidal às nanopartículas em suspensão. Acresce que a estabilidade é preservada após diluição das suspensões aquosas de C₆₀ em meios tamponizados, preparados de forma a mimetizar as condições fisiológicas de sistemas biológicos.
2. A hidroxilação do fulereno C₆₀, tornando a molécula mais hidrofílica, conduz a uma diminuição da sua afinidade pela membrana, o que pode estar na base da ausência de toxicidade das nanopartículas de C₆₀(OH)₁₈₋₂₂ ou da sua muito baixa toxicidade, manifestada a concentrações muito superiores às de C₆₀ (veja-se o caso do crescimento e da atividade respiratória da bactéria aeróbia utilizada como modelo, *Geobacillus stearothermophilus*, da proliferação vegetativa e da atividade fotossintética de *Lemna gibba* e da respiração de mitocôndrias de células animais). Adicionalmente, a hidroxilação é responsável por uma localização das nanopartículas de fulereno nas regiões mais externas

da membrana, ao invés de C_{60} que prefere as regiões mais profundas e hidrofóbicas da bicamada lipídica. A localização mais superficial das nanopartículas de $C_{60}(OH)_{18-22}$ torna-as, por ventura, menos aptas, em relação às nanopartículas de C_{60} , para combater a peroxidação lipídica induzida por um agente oxidante lipofílico (*t*-butil-hidroperóxido), por se encontrarem mais distanciadas dos locais de propagação das reações de oxidação lipídica.

3. As nanopartículas de C_{60} são capazes de prevenir e remediar os efeitos tóxicos de um agente oxidante indutor de morte por apoptose ou necrose (*t*-butil-hidroperóxido), em células nervosas. A hidroxilação, porém, anula esta capacidade às nanopartículas de C_{60} .
4. As nanopartículas de C_{60} , combinadas com lípidos catiónicos (DOTAP) e lípidos auxiliares (DOPE), dão lugar a formulações capazes de constituírem um vetor eficiente para a entrega de moléculas de RNA de interferência em células neuronais.
5. A versatilidade das nanopartículas de C_{60} em combaterem o stresse oxidativo (um evento que tem sido associado à etiologia das doenças neurodegenerativas) e promoverem a entrega de ácidos nucleicos (siRNA), que vão conduzir ao silenciamento de genes eventualmente envolvidos na morte das células nervosas, surge como suporte a um desafio interessante: explorar, no quadro do tratamento (ou prevenção) de doenças neurodegenerativas, uma intervenção antioxidante combinada com terapia génica anti-apoptótica.

Bibliografia

- Aagaard, L., Rossi, J.J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 75-86.
- Abe, T., Takahashi, S., Fukuuchi, Y. (2002). Reduction of Alamar Blue, a novel redox indicator, is dependent on both the glycolytic and oxidative metabolism of glucose in rat cultured neurons. *Neuroscience Letters* 326, 179-182.
- Aitken, R.J., Chaudhry, M.Q., Boxall, A.B.A., Hull, M. (2006). Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine* 56, 300-306.
- Al-Dosari, M., Gao, X. (2009). Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal* 11, 671-681.
- Albertini, R., Abuja, P.M. (1999). Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free radical research* 30, 181-188.
- Ali, S.S., Hardt, J.I., Quick, K.L., Sook Kim-Han, J., Erlanger, B.F., Huang, T.-t., Epstein, C.J., Dugan, L.L. (2004). A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 1191-1202.
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 19, 119-128.
- Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K., Bordyuh, A.B., Dovbeshko, G.I. (2002). Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 364, 8-17.
- Ansar Ahmed, S., Gogal Jr, R.M., Walsh, J.E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* 170, 211-224.
- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (1985). Partition of lindane in synthetic and native membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 820, 165-172.

Bibliografia

- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (1986). Partition of DDT in synthetic and native membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 861, 159-164.
- Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (1987). Partition of malathion in synthetic and native membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 901, 61-66.
- Antunes-Madeira, M.D.C., Almeida, L.M., Madeira, V.M.C. (1991). DDT-membrane interactions studied with two fluorescent probes. *Pesticide Science* 33, 347-357.
- Antunes-Madeira, M.C., Videira, R.A., Madeira, V.M.C. (1994). Effects of parathion on membrane organization and its implications for the mechanisms of toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1190, 149-154.
- Aquino, A., Chan, J., Giolma, K., Loh, M. (2010). The Effect of a Fullerene Water Suspension on the Growth, Cell Viability, and Membrane Integrity of *Escherichia coli* B23. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 14, 13-20.
- Arbogast, J.W., Darmany, A.P., Foote, C.S., Diederich, F.N., Whetten, R.L., Rubin, Y., Alvarez, M.M., Anz, S.J. (1991). Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C₆₀). *The Journal of Physical Chemistry* 95, 11-12.
- Arndt, M., Nairz, O., Vos-Andreae, J., Keller, C., van der Zouw, G., Zeilinger, A. (1999). Wave-particle duality of C₆₀ molecules. *Nature* 401, 680-682.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., Perez, J.M. (2010). Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* 4, 5321-5331.
- Aschberger, K., Johnston, H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Tran, C.L., Hankin, S.M., Peters, S.A.K., Christensen, F.M. (2010). Review of fullerene toxicity and exposure – Appraisal of a human health risk assessment, based on open literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58, 455-473.
- Babu, T.S., Marder, J.B., Tripuranthakam, S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (2001). Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environmental Toxicology Chemistry* 20, 1351-1358.
- Baker, G.L., Gupta, A., Clark, M.L., Valenzuela, B.R., Staska, L.M., Harbo, S.J., Pierce, J.T., Dill, J.A. (2008). Inhalation Toxicity and Lung Toxicokinetics of C₆₀ Fullerene Nanoparticles and Microparticles. *Toxicological Sciences* 101, 122-131.
- Ballesteros, E., Gallego, M., Valcárcel, M. (2000). Analytical potential of fullerene as adsorbent for organic and organometallic compounds from aqueous solutions. *Journal of Chromatography A* 869, 101-110.

- Bandaru, P.R. (2007). Electrical properties and applications of carbon nanotube structures. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 7, 4-5.
- Banker, G., Goslin, K. (1998). Culturing nerve cells (Second Edition). *The MIT Press, Cambridge, MA*.
- Barraud, L., Merle, P., Soma, E., Lefrançois, L., Guerret, S., Chevallier, M., Dubernet, C., Couvreur, P., Trépo, C., Vitvitski, L. (2005). Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Journal of Hepatology* 42, 736-743.
- Bartlett, G.R. (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 234, 466-468.
- Baun, A., Sørensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N.B., Koch, C.B. (2008). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology* 86, 379-387.
- Bedrov, D., Smith, G.D., Davande, H., Li, L. (2008). Passive Transport of C₆₀ Fullerenes through a Lipid Membrane: A Molecular Dynamics Simulation Study. *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 2078-2084.
- Behl, C. (1999). Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiology* 57, 301-323.
- Benn, T.M., Westerhoff, P., Herckes, P. (2011). Detection of fullerenes (C₆₀ and C₇₀) in commercial cosmetics. *Environmental Pollution* 159, 1334-1342.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917.
- Boelsterli, U.A. (2007). Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of how Chemicals Disrupt Biological Targets. CRC Press.
- Bogdanov, M.B., Ferrante, R.J., Mueller, G., Ramos, L.E., Martinou, J.-C., Flint Beal, M. (1999). Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2. *Neuroscience Letters* 262, 33-36.
- Bolskar, R.D., Benedetto, A.F., Husebo, L.O., Price, R.E., Jackson, E.F., Wallace, S., Wilson, L.J., Alford, J.M. (2003). First Soluble M@C₆₀ Derivatives Provide Enhanced Access to Metallofullerenes and Permit in Vivo Evaluation of Gd@C₆₀[C(COOH)₂]₁₀ as a MRI Contrast Agent. *Journal of the American Chemical Society* 125, 5471-5478.
- Borm, P., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E.

Bibliografia

- (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 3, 11.
- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Prato, M. (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 913-923.
- Böttcher, C.J.F., Van Gent, C.M., Pires, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorous determination. *Analytica Chimica Acta* 24, 203-204.
- Böttinger, L., Horvath, S.E., Kleinschroth, T., Hunte, C., Daum, G., Pfanner, N., Becker, T. (2012). Phosphatidylethanolamine and Cardiolipin Differentially Affect the Stability of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Molecular Biology* 423, 677-686.
- Bracher, P.J., Schuster, D.I. (2002). Electron transfer in functionalized fullerenes, Fullerenes: From Synthesis to Optoelectronic Properties. Springer, pp. 163-212.
- Brain, R.A., Solomon, K.R. (2007). A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with *Lemna gibba*. *Nature Protocols* 2, 979-987.
- Brant, J., Lecoanet, H., ne, Wiesner, M. (2005). Aggregation and Deposition Characteristics of Fullerene Nanoparticles in Aqueous Systems. *Journal of Nanoparticle Research* 7, 545-553.
- Brant, J.A., Labille, J., Bottero, J.-Y., Wiesner, M.R. (2006). Characterizing the Impact of Preparation Method on Fullerene Cluster Structure and Chemistry. *Langmuir* 22, 3878-3885.
- Brunet, L.n., Lyon, D.Y., Hotze, E.M., Alvarez, P.J.J., Wiesner, M.R. (2009). Comparative Photoactivity and Antibacterial Properties of C₆₀ Fullerenes and Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 43, 4355-4360.
- Brusadelli, A., Sialino, H., Piepoli, T., Pollio, G., Maggi, A. (2000). Expression of the estrogen-regulated gene Nip2 during rat brain maturation. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18, 317-320.
- Cadenhead, D.A., Kellner, B.M.J., Jacobson, K., Papahadjopoulos, D. (1977). Fluorescent probes in model membranes I: anthroyl fatty acid derivatives in monolayers and liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 16, 5386-5392.
- Cai, J., Wu, M., Nelson, K.C., Sternberg, P., Jones, D.P. (1999). Oxidant-induced apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40, 959-966.

- Calvayrac, R., Bomsel, J., Laval-Martin, D. (1979). Analysis and Characterization of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea (DCMU)-resistant *Euglena*. *Plant Physiology* 63, 857-865.
- Campbell, M. (1995). Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection technique. *Biotechniques* 18, 1027.
- Cardoso, A.M.S., Faneca, H., Almeida, J.A.S., Pais, A.A.C.C., Marques, E.F., de Lima, M.C.P., Jurado, A.S. (2011). Gemini surfactant dimethylene-1,2-bis(tetradecyldimethylammonium bromide)-based gene vectors: A biophysical approach to transfection efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 341-351.
- Cardoso, A.M., Trabulo, S., Cardoso, A.L., Maia, S., Gomes, P., Jurado, A.S., Pedroso de Lima, M.C. (2013). Comparison of the Efficiency of Complexes Based on S413-PV Cell-Penetrating Peptides in Plasmid DNA and siRNA Delivery. *Molecular Pharmaceutics*.
- Cataldo, F. (2002). Encapsulation of C₆₀ fullerene in γ -cyclodextrin: a new concept in the protection of organic substrates and polymers from ozone attack: Kinetic aspects on the reactivity between C₆₀ and O₃. *Polymer Degradation and Stability* 77, 111-120.
- Cayuela, M.L., Millner, P., Slovin, J., Roig, A. (2007). Duckweed (*Lemna gibba*) growth inhibition bioassay for evaluating the toxicity of olive mill wastes before and during composting. *Chemosphere* 68, 1985-1991.
- Chance, B., Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology*. 17, 65-134.
- Chang, R., Violi, A. (2006). Insights into the Effect of Combustion-Generated Carbon Nanoparticles on Biological Membranes: A Computer Simulation Study. *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 5073-5083.
- Chen, C., Xing, G., Wang, J., Zhao, Y., Li, B., Tang, J., Jia, G., Wang, T., Sun, J., Xing, L., Yuan, H., Gao, Y., Meng, H., Chen, Z., Zhao, F., Chai, Z., Fang, X. (2005). Multihydroxylated [Gd@C₈₂(OH)₂₂]_n Nanoparticles: Antineoplastic Activity of High Efficiency and Low Toxicity. *Nano Letters* 5, 2050-2057.
- Chen, D.F., Schneider, G.E., Martinou, J.-C., Tonegawa, S. (1997). Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385, 434-439.
- Cheng, F.-Y., Su, C.-H., Wu, P.-C., Yeh, C.-S. (2010). Multifunctional polymeric nanoparticles for combined chemotherapeutic and near-infrared photothermal cancer therapy in vitro and in vivo. *Chemical Communications* 46, 3167-3169.

Bibliografia

- Chesnoy, S., Huang, L. (2000). Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 27-47.
- Chicco, A.J., Sparagna, G.C. (2007). Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292, C33-C44.
- Conner, S.D., Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17, 1195-1214.
- Davidson, B.L., McCray, P.B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews Genetics* 12, 329-340.
- Deguchi, S., Alargova, R.G., Tsujii, K. (2001). Stable Dispersions of Fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in Water. Preparation and characterization. *Langmuir* 17, 6013-6017.
- Dewez, D., Dautremepuits, C., Jeandet, P., Vernet, G., Popovic, R. (2003). Effects of Methanol on photosynthetic Processes and Growth of *Lemna gibba*. *Photochemistry and Photobiology* 78, 420-424.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315, 161-169.
- Dispersyn, G., Nuydens, R., Connors, R., Borgers, M., Geerts, H. (1999). Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1428, 357-371.
- Donato, M.M., Jurado, A.S., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M. (1997a). Comparative study of the toxic actions of 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane and 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene on the growth and respiratory activity of a microorganism used as a model. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4948-4951.
- Donato, M.M., Jurado, A.S., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (1997b). *Bacillus stearothermophilus* as a Model to Evaluate Membrane Toxicity of a Lipophilic Environmental Pollutant (DDT). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33, 109-116.

- Donato, M.M. (1999). Toxicologia do DDT e DDE: utilização de um microrganismo-modelo. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Donato, M.M., Jurado, A.S., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M. (2000). Membrane lipid composition of *Bacillus stearothermophilus* as affected by lipophilic environmental pollutants: an approach to membrane toxicity assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 145-153.
- Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G., Eklund, P.C. (1995). Science of fullerenes and carbon nanotubes. Academic Press, NY.
- Du, G., Mouithys-Mickalad, A., Sluse, F.E. (1998). Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 1066-1074.
- Dugan, L.L., Lovett, E.G., Quick, K.L., Lotharius, J., Lin, T.T., O'Malley, K.L. (2001). Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism & related disorders* 7, 243-246.
- Dugan, L.L., Turetsky, D.M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., Almlı, C.R., Shen, C.K.-F., Luh, T.-Y., Choi, D.W., Lin, T.-S. (1997). Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 9434-9439.
- Echegoyen, L., Echegoyen, L.E. (1998). Electrochemistry of Fullerenes and Their Derivatives. *Accounts of Chemical Research* 31, 593-601.
- Egelseer, E.M., Leitner, K., Jarosch, M., Hotzy, C., Zayni, S., Sleytr, U.B., Sára, M. (1998). The S-layer proteins of two *Bacillus stearothermophilus* wild-type strains are bound via their N-terminal region to a secondary cell wall polymer of identical chemical composition. *Journal of bacteriology* 180, 1488-1495.
- Egusquiaguirre, S., Igartua, M., Hernández, R., Pedraz, J. (2012). Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clinical and Translational Oncology* 14, 83-93.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- EPA (1996). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4400. Aquatic Plant Toxicity Test using *Lemna* spp., Tiers I and II, EPA 712-C-96-156.
- Esser, C., Martin, W., Dagan, T. (2007). The origin of mitochondria in light of a fluid prokaryotic chromosome model. *Biology Letters* 3, 180-184.

Bibliografia

- Estabrook, R.W. (1967). Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP/O ratios. *Methods in Enzymology* 10, 41-47.
- Eyster, K.M. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advances in Physiology Education* 31, 5-16.
- Fato, R., Degli Esposti, M., Parenti Castelli, G., Lenaz, G. (1986). Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy)stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes. *Biochemistry* 25(11), 3378-3390.
- Fattal, E., Bochot, A. (2006). Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 1203-1223.
- Ferri, K.F., Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* 3, E255-E263.
- Finkbeiner, S. (2000). CREB Couples Neurotrophin Signals to Survival Messages. *Neuron* 25, 11-14.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal Biology and Chemistry* 66, 375-400.
- Foley, S., Crowley, C., Smaih, M., Bonfils, C., Erlanger, B.F., Seta, P., Larroque, C. (2002). Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 116-119.
- Fortner, J.D., Lyon, D.Y., Sayes, C.M., Boyd, A.M., Falkner, J.C., Hotze, E.M., Alemany, L.B., Tao, Y.J., Guo, W., Ausman, K.D., Colvin, V.L., Hughes, J.B. (2005). C₆₀ in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response. *Environmental Science & Technology* 39, 4307-4316.
- Fujita, K., Morimoto, Y., Ogami, A., Myojyo, T., Tanaka, I., Shimada, M., Wang, W.-N., Endoh, S., Uchida, K., Nakazato, T., Yamamoto, K., Fukui, H., Horie, M., Yoshida, Y., Iwahashi, H., Nakanishi, J. (2009). Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C₆₀ fullerene particles. *Toxicology* 258, 47-55.
- Gazotti, P., Malmstrom, K., Crompton, M. (1979). A laboratory manual on transport and bioenergetics. In: *Membrane Biochemistry* (F. Carafoli, G. Semenza, eds.). Springer-Verlag, New York, 62-79.
- Gennis, R.B. (1989). Biomembranes molecular structures and function (cantor, C.R., ed). Springer-Verlag, New York.

- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M. (2004). Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry* 15, 897-900.
- Gornall, A.G., Bardawill, C., David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 177, 751-756.
- Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P. (2004). Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes* 53, S110-S118.
- Guerrieri, F., Kopecky, J., Zanotti, F. (1990). Functional and Immunological Characterization of Mitochondrial F₀F₁ ATP-Synthase, In: Tager, J., Azzi, A., Papa, S., Guerrieri, F. (Eds.), *Organelles in Eukaryotic Cells*. Springer US, pp. 197-208.
- Guldi, D.M., Asmus, K.-D. (1999). Activity of water-soluble fullerenes towards OH-radicals and molecular oxygen. *Radiation Physics and Chemistry* 56, 449-456.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*, Fourth ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Hashida, M., Nishikawa, M., Yamashita, F., Takakura, Y. (2001). Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 52, 187-196.
- Henry, T.B., Menn, F.M., Fleming, J.T., Wilgus, J., Compton, R.N., Sayler, G.S. (2007). Attributing effects of aqueous C₆₀ nano-aggregates to tetrahydrofuran decomposition products in larval zebrafish by assessment of gene expression. *Environmental Health Perspectives* 115(7), 1059-1065.
- Heytler, P. (1979). Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Methods in enzymology* 55, 462-542.
- Hirsch, A., Brettreich, M. (2005). *Fullerenes: Chemistry and reactions*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Holczer, K., Klein, O., Huang, S.-m., Kaner, R.B., Fu, K.-j., Whetten, R.L., Diederich, F. (1991). Alkali-Fulleride Superconductors: Synthesis, Composition, and Diamagnetic Shielding. *Science* 252, 1154-1157.
- Holm, K., Isacson, O. (1999). Factors intrinsic to the neuron can induce and maintain its ability to promote axonal outgrowth: a role for BCL2? *Trends in neurosciences* 22, 269-273.
- Hotze, E.M., Labille, J., Alvarez, P., Wiesner, M.R. (2008). Mechanisms of Photochemistry and Reactive Oxygen Production by Fullerene Suspensions in Water. *Environmental Science & Technology* 42, 4175-4180.

Bibliografia

- Hou, W.-C., Moghadam, B.Y., Westerhoff, P., Posner, J.D. (2011). Distribution of Fullerene Nanomaterials between Water and Model Biological Membranes. *Langmuir* 27, 11899-11905.
- Howard, S., Bottino, C., Brooke, S., Cheng, E., Giffard, R.G., Sapolsky, R. (2002). Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. *Journal of Neurochemistry* 83, 914-923.
- Hristozov, D., Malsch, I. (2009). Hazards and Risks of Engineered Nanoparticles for the Environment and Human Health. *Sustainability* 1, 1161-1194.
- Hui, S.W., Langner, M., Zhao, Y.-L., Ross, P., Hurley, E., Chan, K. (1996). The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophysical journal* 71, 590.
- Jardine, C., Hrudey, S., Shortreed, J., Craig, L., Krewski, D., Furgal, C., McColl, S. (2003). Risk Management Frameworks for Human Health and Environmental Risks. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 6, 569-718.
- Johansen, A., Pedersen, A.L., Jensen, K.A., Karlson, U., Hansen, B.M., Scott-Fordsmand, J.J., Winding, A. (2008). Effects of C₆₀ fullerene nanoparticles on soil bacteria and protozoans. *Environmental Toxicology Chemistry* 27, 1895-1903.
- Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Aschberger, K., Stone, V. (2010). The Biological Mechanisms and Physicochemical Characteristics Responsible for Driving Fullerene Toxicity. *Toxicological Sciences* 114, 162-182.
- Juhel, G., Batisse, E., Hugues, Q., Daly, D., van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J., Jansen, M.A.K. (2011). Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 105, 328-336.
- Jurado, A.S., Santana, A.C., Costa, M.S.D., Madeira, V.M.C. (1987). Influence of Divalent Cations on the Growth and Morphology of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of General Microbiology* 133, 507-513.
- Jurado, A.S., Pinheiro, T.J.T., Madeira, V.M.C. (1991). Physical studies on membrane lipids of *Bacillus stearothermophilus* temperature and calcium effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 289, 167-179.
- Jurado, A.S., Morais, C.M., Santos, S.M., Videira, R.A., Pedroso de Lima, M.C. (2012). A toxicological/Pharmacological Approach to Chemico-Biological Interactions at a Membrane level. The role of membrane lipids in a toxicological context: lessons from microorganism adaptive responses. Índia, Research Signpost.

- Kalberlah, F., Schneider, K., Schuhmacher-Wolz, U. (2003). Uncertainty in toxicological risk assessment for non-carcinogenic health effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 37, 92-104.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., Kobatake, Y. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *The Journal of Membrane Biology* 49, 105-121.
- Katragadda, C.S., Choudhury, P.K., Murthy, P. (2010). Nanoparticles as Non-Viral Gene Delivery Vectors. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 44, 109-111.
- Kikuchi, H., Suzuki, N., Ebihara, K., Morita, H., Ishii, Y., Kikuchi, A., Sugaya, S., Serikawa, T., Tanaka, K. (1999). Gene delivery using liposome technology. *Journal of Controlled Release* 62, 269-277.
- Kim, H.-E., Yoon, S.-Y., Lee, J.-E., Choi, W.-S., Jin, B.K., Oh, T.H., Markelonis, G.J., Chun, S.-Y., Oh, Y.J. (2001). MPP+ Downregulates Mitochondrially Encoded Gene Transcripts and Their Activities in Dopaminergic Neuronal Cells: Protective Role of Bcl-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 659-665.
- Kim, J.-A., Kang, Y.S., Kim, Y.O., Lee, S.H., Lee, Y.S. (1998). Role of Ca²⁺ influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells. *Experimental Molecular Medicine* 30, 137-144.
- Klavins, M., Anson, L. (2010). Study of interaction between humic acids and fullerene C₆₀ using fluorescence quenching approach. *Ecological Chemistry and Engineering* 17, No. 3.
- Kleinjans, J.C.S. (2003). Principles in toxicological risk analysis. *Toxicology Letters* 140-141, 311-315.
- Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y. (2008). Sequence-and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452, 591-597.
- Koynova, R., Tenchov, B., Wang, L., MacDonald, R.C. (2009). Hydrophobic moiety of cationic lipids strongly modulates their transfection activity. *Molecular Pharmaceutics* 6, 951-958.
- Koziara, J.M., Lockman, P.R., Allen, D.D., Mumper, R.J. (2004). Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *Journal of Controlled Release* 99, 259-269.

Bibliografia

- Krätschmer, W., Fostiropoulos, K., Huffman, D.R. (1990). The infrared and ultraviolet absorption spectra of laboratory-produced carbon dust: evidence for the presence of the C₆₀ molecule. *Chemical Physics Letters* 170, 167-170.
- Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., Smalley, R.E. (1985). C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature* 318, 14.
- Krusic, P.J., Wasserman, E., Keizer, P.N., Morton, J.R., Preston, K.F. (1991). Radical Reactions of C₆₀. *Science* 254, 1183-1185.
- Kubatova, H., Zemanova, E., Klouda, K., Bilek, K., Kadukova, J. (2013). Effects of C₆₀ fullerene and its derivatives on selected microorganisms. *Journal of Microbiology Research* 3 No.4, 152-162.
- Kufel, L., Strzalek, M., Wysokinska, U., Biardzka, E., Okninska, S., Rys, K. (2012). Growth rate of duckweeds (lemnaceae) in relation to the internal and ambient nutrient concentrations - testing the droop. *Polish Journal of Ecology*, 60 (62), 241-249.
- Kulkarni, P.P., Jafvert, C.T. (2007). Solubility of C₆₀ in Solvent Mixtures. *Environmental Science & Technology* 42, 845-851.
- Lam, C.-W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L. (2004). Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicological Sciences* 77, 126-134.
- Laranjinha, J.A.N., Almeida, L.M., Madeira, V.M.C. (1992). Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: Quenching of cis-parinaric acid fluorescence. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 297, 147-154.
- Lee, M.-R., Chang, C.-M., Dou, J. (2007). Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes in water at sub-ng l-l levels by solid-phase microextraction coupled to cryo-trap gas chromatography–mass spectrometry. *Chemosphere* 69, 1381-1387.
- Li, D., Lyon, D.Y., Li, Q., Alvarez, P.J.J. (2008). Effect of soil sorption and aquatic natural organic matter on the antibacterial activity of a fullerene water suspension. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1888-1894.
- Li, L., Davande, H., Bedrov, D., Smith, G.D. (2007a). A Molecular Dynamics Simulation Study of C60 Fullerenes Inside a Dimyristoylphosphatidylcholine Lipid Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 4067-4072.
- Li, Z., Hulderman, T., Salmen, R., Chapman, R., Leonard, S.S., Young, S.-H., Shvedova, A., Luster, M.I., Simeonova, P.P. (2007b). Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environmental Health Perspectives* 115, 377.

- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11, 591 - 592.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry* 80, 780-787.
- Liu, Y., Li, W., Lao, F., Liu, Y., Wang, L., Bai, R., Zhao, Y., Chen, C. (2011). Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterials* 32, 8291-8303.
- Liu, Z., Winters, M., Holodniy, M., Dai, H. (2007). siRNA Delivery into Human T Cells and Primary Cells with Carbon-Nanotube Transporters. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 2023-2027.
- Lopez, S., Arias, C. (2010). How Viruses Hijack Endocytic Machinery. *Nature Education* 3 (9):16.
- Love, S.A., Maurer-Jones, M.A., Thompson, J.W., Lin, Y.S., Hynes, C.L. (2012). Assessing nanoparticle toxicity. *Annual Review of Analytical Chemistry* 5, 181-205.
- Lovern, S.B., Klaper, R. (2006). *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1132-1137.
- Luxo, C., Jurado, A.S., Madeira, V.M. (1998). Lipid composition changes induced by tamoxifen in a bacterial model system. *Biochimica Biophysica Acta* 1369, 71-84.
- Luxo, C., Jurado, A.S., Custódio, J.B.A., Madeira, V.M.C. (2001). Toxic effects of tamoxifen on the growth and respiratory activity of *Bacillus stearothermophilus*. *Toxicology in Vitro* 15, 303-305.
- Luxo, C., Jurado, A.S., Madeira, V.t.M.C., Silva, M.T. (2003). Tamoxifen induces ultrastructural alterations in membranes of *Bacillus Stearothermophilus*. *Toxicology in Vitro* 17, 623-628.
- Lyon, D.Y., Adams, L.K., Falkner, J.C., Alvarez, P.J.J. (2006). Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size†. *Environmental Science & Technology* 40, 4360-4366.
- Ma, Z., Li, J., He, F., Wilson, A., Pitt, B., Li, S. (2005). Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330, 755-759.

Bibliografia

- Madeira, V.M., Antunes-Madeira, M.C., Carvalho, A.P. (1974). Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 58, 897-904.
- Makino, A., Miyake, C., Yokota, A. (2002). Physiological Functions of the Water–Water Cycle (Mehler Reaction) and the Cyclic Electron Flow around PSI in Rice Leaves. *Plant and Cell Physiology* 43, 1017-1026.
- Markovic, Z., Trajkovic, V. (2008). Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* 29, 3561-3573.
- Martins, J.D., Monteiro, J.P., Antunes-Madeira, M.C., Jurado, A.S., Madeira, V.M.C. (2003). Use of the microorganism *Bacillus stearothermophilus* as a model to evaluate toxicity of the lipophilic environmental pollutant endosulfan. *Toxicology in Vitro* 17, 595-601.
- Martins, J. D. (2008). Toxicologia celular de organoestanhados. Tese de mestrado, Departamento de Zoologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Masini, A., Ceccarelli-Stanzani, D., Muscatello, U. (1984). An investigation on the effect of oligomycin on state-4 respiration in isolated rat-liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 767, 130-137.
- Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdorster, G., Philbert, M.A., Ryan, J., Seaton, A., Stone, V., Tinkle, S.S., Tran, L., Walker, N.J., Warheit, D.B. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444, 267-269.
- McEwen, C.N., McKay, R.G., Larsen, B.S. (1992). C₆₀ as a radical sponge. *Journal of the American Chemical Society* 114, 4412-4414.
- Medina, C., Santos-Martinez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I., Radomski, M.W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology* 150, 552-558.
- Mitchell, P. (2011). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807, 1507-1538.
- Mok, K., Cullis, P.R. (1997). Structural and fusogenic properties of cationic liposomes in the presence of plasmid DNA. *Biophysical journal* 73, 2534-2545.
- Monteiro, J.P., Martins, J.D., Luxo, P.C., Jurado, A.S., Madeira, V.M.C. (2003). Molecular mechanisms of the metabolite 4-hydroxytamoxifen of the anticancer drug tamoxifen: use of a model microorganism. *Toxicology in Vitro* 17, 629-634.

- Monteiro, J.P., Jurado, A.S., Moreno, A.J.M., Madeira, V.M.C. (2005). Toxicity of methoprene as assessed by the use of a model microorganism. *Toxicology in Vitro* 19, 951-956.
- Monteiro, J.P., Oliveira, P.J., Moreno, A.J.M., Jurado, A.S. (2008a). Disruption of hepatic mitochondrial bioenergetics is not a primary mechanism for the toxicity of methoprene – Relevance for toxicological assessment. *Chemosphere* 72, 1347-1354.
- Monteiro, J., Videira, R., Matos, M., Dinis, A., Jurado, A. (2008b). Non-Selective Toxicological Effects of the Insect Juvenile Hormone Analogue Methoprene. A Membrane Biophysical Approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150, 243-257.
- Monteiro, J., Martins, A., Lúcio, M., Reis, S., Geraldes, C.G.C., Oliveira, P., Jurado, A. (2011a). Interaction of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) with lipid membrane systems: a biophysical approach with relevance to mitochondrial uncoupling. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 43, 287-298.
- Monteiro, J.P., Martins, A.F., Lúcio, M., Reis, S., Pinheiro, T.J.T., Geraldes, C.F.G.C., Oliveira, P.J., Jurado, A.S. (2011b). Nimesulide interaction with membrane model systems: Are membrane physical effects involved in nimesulide mitochondrial toxicity? *Toxicology in Vitro* 25, 1215-1223.
- Monteiro, J.P., Martins, A.F., Nunes, C., Morais, C.M., Lúcio, M., Reis, S., Pinheiro, T.J.T., Geraldes, C.F.G.C., Oliveira, P.J., Jurado, A.S. (2013a). A biophysical approach to menadione membrane interactions: Relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 1899-1908.
- Monteiro, J.P., Silva, A.M., Jurado, A.S., Oliveira, P.J. (2013b). Rapeseed oil-rich diet alters in vitro menadione and nimesulide hepatic mitochondrial toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 60, 479-487.
- Moore, M.N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32, 967-976.
- Moreno, A.J.M., Madeira, V.M.C. (1991). Mitochondrial bioenergetics as affected by DDT. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1060, 166-174.
- Moreno, A.J.M., Serafim, T.L., Oliveira, P.J., Madeira, V.M.C. (2007). Inhibition of mitochondrial bioenergetics by carbaryl is only evident for higher concentrations – Relevance for carbaryl toxicity mechanisms. *Chemosphere* 66, 404-411.

Bibliografia

- Mroz, P., Pawlak, A., Satti, M., Lee, H., Wharton, T., Gali, H., Sarna, T., Hamblin, M.R. (2007). Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 711-719.
- Nakamura, E., Isobe, H., Tomita, N., Sawamura, M., Jinno, S., Okayama, H. (2000). Functionalized Fullerene as an Artificial Vector for Transfection. *Angewandte Chemie International Edition* 39, 4254-4257.
- Nathwani, A.C., Davidoff, A.M., Linch, D.C. (2005). A review of gene therapy for haematological disorders. *British Journal of Haematology* 128, 3-17.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2009). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition ed. W. H. Freeman.
- Ni, J., Wu, Q., Li, Y., Guo, Z., Tang, G., Sun, D., Gao, F., Cai, J. (2008). Cytotoxic and radiosensitizing effects of nano-C₆₀ on tumor cells in vitro. *Journal of Nanoparticle Research* 10, 643-651.
- Nielsen, G.D., Roursgaard, M., Jensen, K.A., Poulsen, S.S., Larsen, S.T. (2008). In vivo Biology and Toxicology of Fullerenes and Their Derivatives. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103, 197-208.
- Noguchi, A., Furuno, T., Kawaura, C., Nakanishi, M. (1998). Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes. *FEBS Letters* 433, 169-173.
- Oberdörster, E. (2004). Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environ Health Perspect* 112, 10.
- Oberdörster, G., Ferin, J., Lehnert, B.E. (1994). Correlation between particle aixe, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental Health Perspectives* 5:173-9.
- Ochekpe, N.A., Olorunfemi, P.O., Ngwuluka, N.C. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8(3), 265-274.
- OECD (2002). Guidelines for the testing of chemicals. Environment Directorate, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD (2009). Guidance manual for the testing of manufactured nanomaterials: OECD's sponsorship programme, First revision. *ENV/JM/MONO(2009)20/REV*.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922.

- Owen, R., Depledge, M. (2005). Nanotechnology and the environment: Risks and rewards. *Marine Pollution Bulletin* 50, 609-612.
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M.C. (1995). Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1229, 187-192.
- Partha, R., Conyers, J.L. (2009). Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *International journal of Nanomedicine* 4, 261-275.
- Pereira, M., Bandejas, T., Fernandes, A., Lemos, R., Melo, A.P., Teixeira, M. (2004). Respiratory Chains from Aerobic Thermophilic Prokaryotes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36, 93-105.
- Pereira, S.P., Fernandes, M.A.S., Martins, J.D., Santos, M.S., Moreno, A.J.M., Vicente, J.A.F., Videira, R.A., Jurado, A.S. (2009). Toxicity assessment of the herbicide metolachlor comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicology in Vitro* 23, 1585-1590.
- Perreault, F., Oukarroum, A., Pirastru, L., Sirois, L., Gerson Matias, W., Popovic, R. (2010). Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll a Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. *Journal of Botany* 2010, 9.
- Pfeffer, W. (1877). *Osmotische Untersuchungen: Studien zur Zell-Mechanik*, Engelmann. Leipzig.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., Schägger, H. (2003). Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 52873-52880.
- Phala, N., Steen, E. (2007). Intrinsic reactivity of gold nanoparticles: Classical, semi-empirical and DFT studies. *Gold Bulletin* 40, 150-153.
- Pickering, K.D., Wiesner, M.R. (2005). Fullerol-Sensitized Production of Reactive Oxygen Species in Aqueous Solution. *Environmental Science & Technology* 39, 1359-1365.
- Pinaud, F., Michalet, X., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Iyer, G., Weiss, S. (2006). Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials* 27, 1679-1687.
- Piret, J.-P., Arnould, T., Fuks, B., Chatelain, P., Remacle, J., Michiels, C. (2004). Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology* 67, 611-620.
- Porter, A.E., Muller, K., Skepper, J., Midgley, P., Welland, M. (2006). Uptake of C₆₀ by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: Studied by

Bibliografia

- high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomaterialia* 2, 409-419.
- Powell, W., Cozzi, F., Moss, G., Thilgen, C., Hwu, R.-R., Yerin, A. (2002). Nomenclature for the C₆₀-I h and C₇₀-D 5h (6) fullerenes (IUPAC Recommendations 2002). *Pure and applied chemistry* 74, 629-695.
- Prat, F., Stackow, R., Bernstein, R., Qian, W., Rubin, Y., Foote, C.S. (1999). Triplet-State Properties and Singlet Oxygen Generation in a Homologous Series of Functionalized Fullerene Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A* 103, 7230-7235.
- Prato, M. (1997). [60] Fullerene chemistry for materials science applications. *Journal of Materials Chemistry* 7(7), 1097-1109.
- Prats, M., Teissie, J., Tocanne, J.-F. (1986). Lateral proton conduction at lipid-water interfaces and its implications for the chemiosmotic-coupling hypothesis. *Nature* 322, 756-758.
- Prylutska, S., Grynyuk, I., Palyvoda, K., Matyshevska, O. (2010). Photoinduced cytotoxic effect of fullerenes C₆₀ on transformed T-lymphocytes. *Experimental Oncology* 32, 29-32.
- Prylutska, S.V., Grynyuk, I.I., Matyshevska, O.P., Prylutsky, Y., Ritter, U., Scharff, P. (2008). Anti-oxidant Properties of C₆₀ Fullerenes in vitro. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* 16, 698-705.
- Pugazhenth, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E., Reusch, J.E.-B. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10761-10766.
- Qiao, R., Roberts, A.P., Mount, A.S., Klaine, S.J., Ke, P.C. (2007). Translocation of C₆₀ and Its Derivatives Across a Lipid Bilayer. *Nano Letters* 7, 614-619.
- Rade, I., Natasa, R., Biljana, G., Aleksandar, D., Borut, S. (2008). Bioapplication and activity of fullereneol C₆₀(OH)₂₄. *African Journal of Biotechnology* 7(25), 4940-4050.
- Ramakanth, I., Patnaik, A. (2008). Characteristics of solubilization and encapsulation of fullerene C₆₀ in non-ionic Triton X-100 micelles. *Carbon* 46, 692-698.
- Rastogi, I.D. (2012). Nanotechnology: Safety paradigms. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 4(1), 1-12.
- Reynolds, A., Laurie, C., Lee Mosley, R., Gendelman, H.E. (2007). Oxidative Stress and the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders, In: Giacinto Bagetta, M.T.C., Stuart, A.L. (Eds.), *International Review of Neurobiology*. Academic Press, pp. 297-325.

- Rosa, S.M.L.J., Antunes-Madeira, M.d.C., Matos, M.J., Jurado, A.S., Madeira, V.t.M.C. (2000). Lipid composition and dynamics of cell membranes of *Bacillus stearothermophilus* adapted to amiodarone. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1487, 286-295.
- Rüdel, A., Hentges, R., Becker, U., Chakraborty, H.S., Madjet, M.E., Rost, J.M. (2002). Imaging Delocalized Electron Clouds: Photoionization of C₆₀ in Fourier Reciprocal Space. *Physical review letters* 89, 125503.
- Santos, N.C., Prieto, M., Castanho, M.A.R.B. (2003). Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1612, 123-135.
- Sapra, P., Allen, T.M. (2003). Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in lipid research* 42, 439-462.
- Sardão, V., Oliveira, P., Holy, J., Oliveira, C., Wallace, K. (2007). Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide - characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biology* 8, 11.
- 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. (2004). The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes. *Nano Letters* 4, 1881-1887.
- Sayes, C.M., Gobin, A.M., Ausman, K.D., Mendez, J., West, J.L., Colvin, V.L. (2005). Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 26, 7587-7595.
- Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J., Hussain, S.M. (2011). Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3, 410-420.
- Shinohara, N., Matsumoto, T., Gamo, M., Miyauchi, A., Endo, S., Yonezawa, Y., Nakanishi, J. (2008). Is Lipid Peroxidation Induced by the Aqueous Suspension of Fullerene C₆₀ Nanoparticles in the Brains of *Cyprinus carpio*? *Environmental Science & Technology* 43, 948-953.
- Silva, M.T., Macedo, P. (1983). A comparative ultrastructural study of the membranes of *Mycobacterium leprae* and of cultivable *Mycobacterium*. *Biology of the Cell* 47, 383-386.
- Simko, M., Mattsson, M.-O. (2010). Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: A critical review. *Particle and Fibre Toxicology* 7, 42.

Bibliografia

- Simões, S., Pires, P., Cruz, M., Düzgüneş, N., Pedroso de Lima, M.C. (2003). Gene delivery by cationic liposome–DNA complexes containing transferrin or serum albumin. *Methods in enzymology* 373, 369-383.
- Simões, S., Filipe, A., Faneca, H., Mano, M., Penacho, N., Düzgüneş, N., Pedroso de Lima, M. (2005). Cationic liposomes for gene delivery. *Expert opinion on drug delivery* 2, 237-254.
- Sitharaman, B., Tran, L.A., Pham, Q.P., Bolskar, R.D., Muthupillai, R., Flamm, S.D., Mikos, A.G., Wilson, L.J. (2007). Gadofullerenes as nanoscale magnetic labels for cellular MRI. *Contrast Media & Molecular Imaging* 2, 139-146.
- Skulachev, V.P., Sharaf, A.A., Liberman, E.A. (1967). Proton Conductors in the Respirator Chain and Artificial Membranes. *Nature* 216, 718-719.
- Song, Y.K., Liu, F., Chu, S., Liu, D. (1997). Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Human gene therapy* 8, 1585-1594.
- Spurr, A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research* 26, 31-43.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D. (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44784-44790.
- Su, Y., Xu, J.-y., Shen, P., Li, J., Wang, L., Li, Q., Li, W., Xu, G.-t., Fan, C., Huang, Q. (2010). Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fulleranol in different cell lines. *Toxicology* 269, 155-159.
- Tang, Y.J., Ashcroft, J.M., Chen, D., Min, G., Kim, C.-H., Murkhejee, B., Larabell, C., Keasling, J.D., Chen, F.F. (2007). Charge-Associated Effects of Fullerene Derivatives on Microbial Structural Integrity and Central Metabolism. *Nano Letters* 7, 754-760.
- Taylor, R. (2006). Addition reactions of fullerenes. *Comptes Rendus Chimie* 9, 982-1000.
- Teodoro, J.S., Simões, A.M., Duarte, F.V., Rolo, A.P., Murdoch, R.C., Hussain, S.M., Palmeira, C.M. (2011). Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. *Toxicology in Vitro* 25, 664-670.
- Thomas, C., Mackey, M.M., Diaz, A.A., Cox, D.P. (2009). Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Report* 14, 102-108.
- Tiemann, K., Rossi, J.J. (2009). RNAi-based therapeutics—current status, challenges and prospects. *EMBO molecular medicine* 1, 142-151.

- Tóth, É., Bolskar, R.D., Borel, A., González, G., Helm, L., Merbach, A.E., Sitharaman, B., Wilson, L.J. (2004). Water-Soluble Gadofullerenes: Toward High-Relaxivity, pH-Responsive MRI Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society* 127, 799-805.
- Tros de Ilarduya, C., Sun, Y., Düzgüneş, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40, 159-170.
- Tutt, L.W., Kost, A. (1992). Optical limiting performance of C₆₀ and C₇₀ solutions. *Nature* 356, 225-226.
- Usenko, C.Y., Harper, S.L., Tanguay, R.L. (2007). In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon* 45, 1891-1898.
- Usenko, C.Y., Harper, S.L., Tanguay, R.L. (2008). Fullerene C₆₀ exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229, 44-55.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology* 7, 65.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 112-124.
- Verkhovskiy, M.I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M.L., Morgan, J.E., Wikstrom, M. (1999). Proton translocation by cytochrome c oxidase. *Nature* 400, 480-483.
- Vichai, V., Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1, 1112-1116.
- Videira, R.A., do Carmo Antunes-Madeira, M., Madeira, V.M.C. (1996). Interaction of ethylazinos with the physical organization of model and native membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1281, 65-72.
- Videira, R.A., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (1999). Biophysical perturbations induced by ethylazinos in lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 97, 139-153.
- Videira, R.A., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (2001). Ethylazinos Interaction with Membrane Lipid Organization Induces Increase of Proton Permeability and

Bibliografia

- Impairment of Mitochondrial Bioenergetic Functions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175, 209-216.
- Videira, R.A., Antunes-Madeira, M.C., Madeira, V.M.C. (2002). Differential effects induced by α - and β -endosulfan in lipid bilayer organization are reflected in proton permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1564, 140-148.
- Virág, L., Szabó, É., Gergely, P., Szabó, C. (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters* 140, 113-124.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R., Burns, C.P. (1994). Free Radical-Mediated Lipid Peroxidation in Cells: Oxidizability Is a Function of Cell Lipid bis-Allylic Hydrogen Content. *Biochemistry* 33, 4449-4453.
- Wang, I.C., Tai, L.A., Lee, D.D., Kanakamma, P.P., Shen, C.K.F., Luh, T.-Y., Cheng, C.H., Hwang, K.C. (1999). C₆₀ and Water-Soluble Fullerene Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation. *Journal of Medicinal Chemistry* 42, 4614-4620.
- Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M.G., Au, J.S. (2010). Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *The AAPS Journal* 12, 492-503.
- Weiss, F.D., Elkind, J.L., O'Brien, S.C., Curl, R.F., Smalley, R.E. (1988). Photophysics of metal complexes of spheroidal carbon shells. *Journal of the American Chemical Society* 110, 4464-4465.
- White, S., Jacobs, R., King, G. (1987). Partial specific volumes of lipid and water in mixtures of egg lecithin and water. *Biophysical journal* 52, 663-665.
- Wisdom, C., Welker, N.E. (1973). Membranes of *Bacillus stearotherophilus*: factors affecting protoplast stability and thermstability of alkaline phosphatase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *Journal of bacteriology* 114, 1336-1345.
- Wong, S.Y., Pelet, J.M., Putnam, D. (2007). Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future. *Progress in Polymer Science* 32, 799-837.
- Xia, X.R., Monteiro-Riviere, N.A., Riviere, J.E. (2010). Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C₆₀) topically exposed in industrial organic solvents. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242, 29-37.
- Yadav, B.C., Kumar, R. (2008). Structure, properties and applications of fullerenes. *International Journal of Nanotechnology and Applications* 2, 15-24.
- Yamakoshi, Y., Umezawa, N., Ryu, A., Arakane, K., Miyata, N., Goda, Y., Masumizu, T., Nagano, T. (2003). Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene

- (C₆₀) as Potential Medicines: O₂[•] versus ¹O₂. *Journal of the American Chemical Society* 125, 12803-12809.
- Yang, D., Zhao, Y., Guo, H., Li, Y., Tewary, P., Xing, G., Hou, W., Oppenheim, J.J., Zhang, N. (2010). [Gd@C₈₂(OH)₂₂]_n Nanoparticles Induce Dendritic Cell Maturation and Activate Th1 Immune Responses. *ACS Nano* 4, 1178-1186.
- Yang, L., Watts, D.J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters* 158, 122-132.
- Yin, H., Too, H.P., Chow, G.M. (2005). The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials* 26, 5818-5826.
- Yin, J.-J., Lao, F., Fu, P.P., Wamer, W.G., Zhao, Y., Wang, P.C., Qiu, Y., Sun, B., Xing, G., Dong, J., Liang, X.-J., Chen, C. (2009). The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 30, 611-621.
- Yin, J.-J., Lao, F., Meng, J., Fu, P.P., Zhao, Y., Xing, G., Gao, X., Sun, B., Wang, P.C., Chen, C., Liang, X.-J. (2008). Inhibition of Tumor Growth by Endohedral Metallofullerenol Nanoparticles Optimized as Reactive Oxygen Species Scavenger. *Molecular Pharmacology* 74, 1132-1140.
- Yoo, J.W., Hong, S.W., Kim, S., Lee, D.-k. (2006). Inflammatory cytokine induction by siRNAs is cell type- and transfection reagent-specific. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347, 1053-1058.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., Dowhan, W. (2002). Gluing the Respiratory Chain Together: Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* 277, 43553-43556.
- Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., Juan-Vergara, H.S., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R.F., Mohapatra, S.S. (2005). Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nature Medicine* 11, 56-62.
- Zhao, B., He, Y.-Y., Bilski, P.J., Chignell, C.F. (2008). Pristine (C₆₀) and Hydroxylated [C₆₀(OH)₂₄] Fullerene Phototoxicity towards HaCaT Keratinocytes: Type I vs Type II Mechanisms. *Chemical Research in Toxicology* 21, 1056-1063.
- Zhao, K., Luo, G., Giannelli, S., Szeto, H.H. (2005). Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. *Biochemical Pharmacology* 70, 1796-1806.

Bibliografia

- Zhao, Y., Zhao, B. (2013). Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 10.
- Zhou, Z., Lenk, R.P., Dellinger, A., Wilson, S.R., Sadler, R., Kepley, C.L. (2010). Liposomal Formulation of Amphiphilic Fullerene Antioxidants. *Bioconjugate Chemistry* 21, 1656-1661.
- Zhu, S., Oberdörster, E., Haasch, M.L. (2006). Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C₆₀) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow. *Marine Environmental Research* 62, Supplement 1, S5-S9.
- Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S. (2009). Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to Daphnia magna. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 67-75.

ANEXOS

ANEXO I

**Os herbicidas alacloro e linurão inibem com diferente severidade o crescimento da
bactéria *Geobacillus stearothermophilus***

A Figura 1 mostra o efeito dos herbicidas alacloro (Fig. 1A) e linurão (Fig. 1B) no crescimento de culturas de *Geobacillus stearothermophilus* em meio líquido. A adição de concentrações crescentes dos herbicidas ao meio de cultura induz uma inibição progressivamente mais severa do crescimento bacteriano que se traduz por um prolongamento da fase de latência, uma diminuição da taxa específica de crescimento e uma redução da densidade populacional máxima atingida em fase estacionária. O crescimento de *G. stearothermophilus* é completamente inibido na presença de 200 μM de linurão, concentração a que o alacloro afeta ainda pouco significativamente o desenvolvimento das culturas bacterianas.

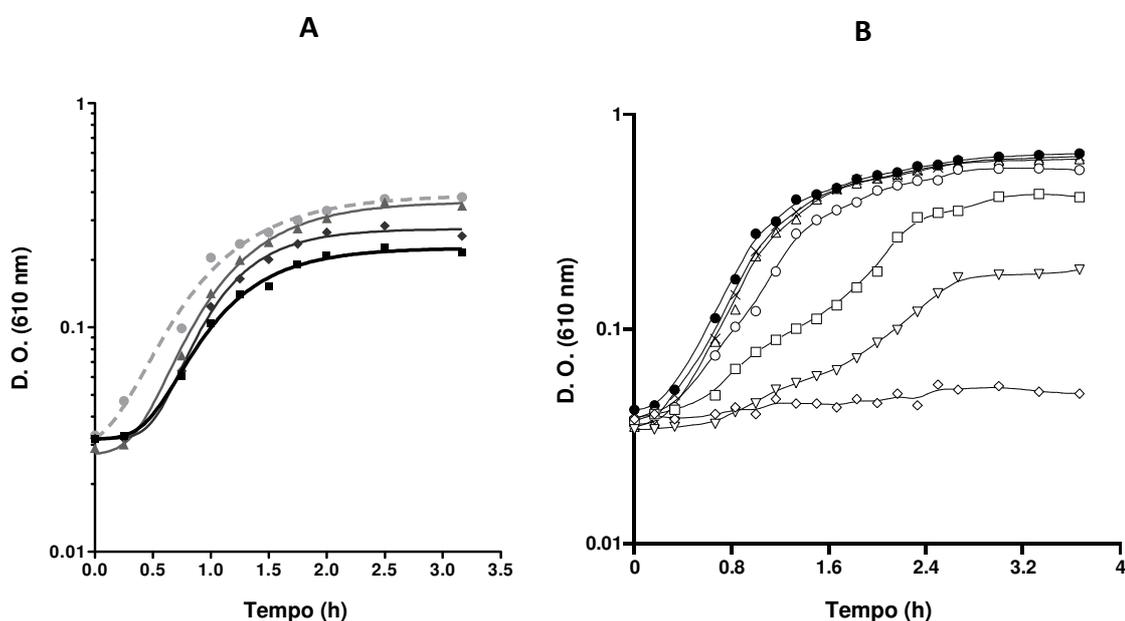


Figura 1 – Efeito dos herbicidas alacloro e linurão no crescimento de *G. stearothermophilus*, à temperatura de 65 °C (temperatura ótima de crescimento). As bactérias foram cultivadas em meio L-Broth na ausência (●) ou na presença de (A) alacloro às concentrações de 300 μM (Δ), 400 μM (\blacklozenge) e 500 μM (\blacksquare) e (B) linurão às concentrações de 10 μM (\times), 25 μM (Δ), 50 μM (\circ), 75 μM (\square), 100 μM (∇) e 200 μM (\diamond). O crescimento foi seguido por turbidimetria (pseudo-absorvência), fazendo leituras da densidade ótica (D. O.) a 610 nm, a intervalos de tempo regulares. As curvas de crescimento apresentadas em A ou em B foram obtidas numa única experiência de crescimento, tomada como típica de três ou mais ensaios independentes.

A Figura 2 ilustra, com o linurão, a forma como se determina a concentração inibitória de herbicida (IC_{50}) que conduz a uma redução de 50% da taxa específica de crescimento em relação ao controlo (cultura desenvolvida na ausência de herbicida). Os valores das taxas específicas de crescimento para as várias concentrações de herbicidas constam da Tabela I.

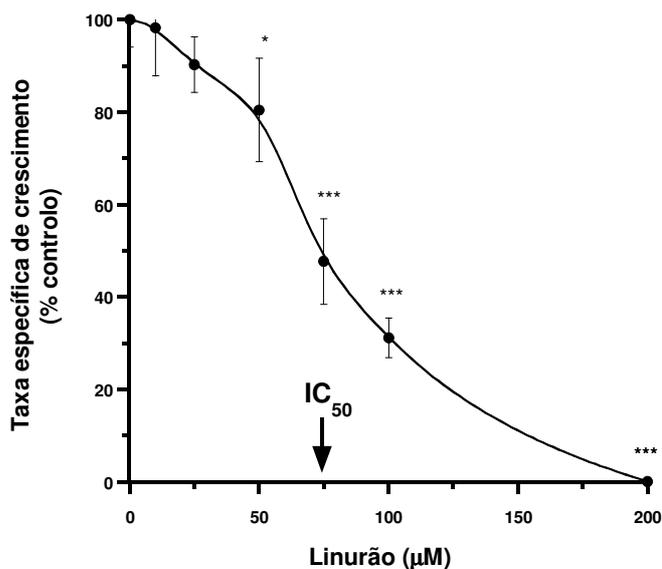


Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de linurão na taxa específica de crescimento de *G. stearothermophilus*. Os valores apresentados nesta figura (média \pm desvio-padrão) foram calculados a partir de curvas de crescimento de três ou mais ensaios (exemplificados na Figura 1B) conforme consta da Tabela I, tendo sido expressos em percentagem do controlo (cultura de *G. stearothermophilus* na ausência de linurão). A concentração de linurão capaz de induzir uma redução de 50% na taxa específica de crescimento de *G. stearothermophilus* é igual a 74 μ M (IC_{50} indicado pela seta). Os valores da taxa específica de crescimento foram comparados com os valores do controlo utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

Tabela I – Taxas específicas de crescimento de culturas de *G. stearothermophilus* na presença de concentrações crescentes de alacloro e linurão. Os valores da taxa específica de crescimento foram comparados com os valores do controlo utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p < 0,05 e ***p < 0,001

	μM	Taxa específica de crescimento (h^{-1})
Alacloro	0	$2,48 \pm 0,16$
	300	$2,29 \pm 0,17$
	400	$1,66 \pm 0,05^{**}$
	500	$1,58 \pm 0,31^{***}$
Linurão	0	$2,08 \pm 0,27$
	10	$2,05 \pm 0,22$
	25	$1,88 \pm 0,13$
	50	$1,68 \pm 0,23^*$
	75	$0,99 \pm 0,19^{***}$
	100	$0,65 \pm 0,09^{***}$
	200	0^{***}

É notório que o efeito inibitório de linurão no crescimento bacteriano se faz sentir a concentrações muito inferiores às de alacloro, tendo sido determinado um valor de IC_{50} de $74 \mu\text{M}$ (Fig. 2). Embora as experiências de crescimento conduzidas com alacloro não tenham permitido determinar o correspondente IC_{50} , os valores que constam da Tabela I asseguram que IC_{50} para alacloro deve ter um valor superior a $500 \mu\text{M}$.

ANEXO II

O inseticida DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofeniletano)) afeta a morfologia da bactéria *Geobacillus stearothermophilus*

A Figura 1 mostra a morfologia da bactéria *Geobacillus stearothermophilus* na ausência de DDT ao fim de 60 minutos de cultura. A célula bacteriana possui a parede celular intacta, a membrana citoplasmática contínua e com perfil assimétrico, o nucleóide e vários ribossomas. A Figura 2 evidencia as alterações morfológicas na bactéria quando cultivadas na presença de DDT 5 μM durante 30 minutos. A bactéria apresenta a membrana citoplasmática com perfil simétrico (Fig. 2A) e com rutura e zonas de degradação extensas da parede celular e membrana citoplasmática (Fig. 2B), com a saída de material citoplasmático para o exterior da célula. Observa-se ainda a existência de massas densas de material amorfo no interior da célula, em resultado da floculação da matriz citoplasmática (Fig. 2B).

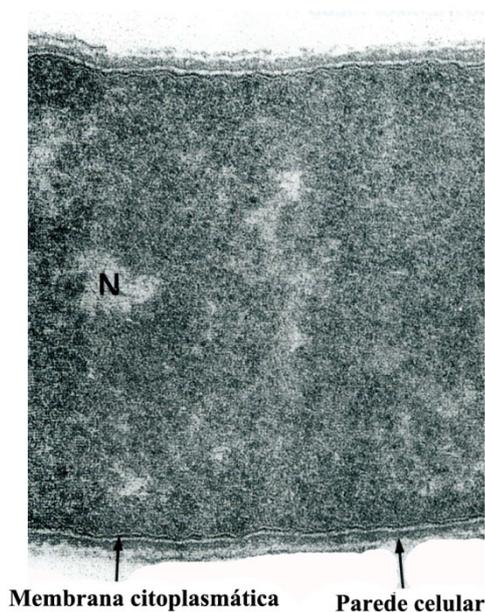


Figura 1 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de células de *G. stearothermophilus* na ausência de DDT que mostram o perfil assimétrico e contínuo da membrana citoplasmática e a parede celular. No interior da célula bacteriana o nucleóide (designado por N) e os ribossomas. x11700. (Extratos de micrografias apresentadas na Tese de Doutoramento de M. M. Donato, 1999, Coimbra)

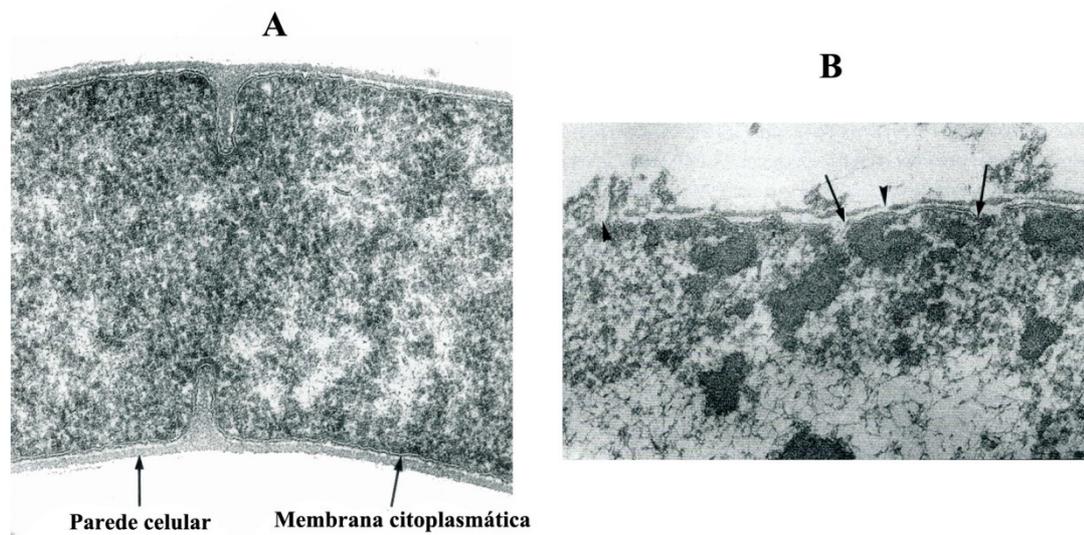


Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de *G. stearothermophilus* que cresceram na presença de DDT 5 μ M. (A) As células evidenciam uma alteração no perfil da membrana citoplasmática de assimétrico para simétrico. x 91200. (B) A célula evidencia ruturas na parede celular e membrana citoplasmática (setas) com saída do material citoplasmático para o exterior da célula e o citoplasma aparece com massas densas de material amorfo em resultado da floculação da matriz citoplasmática. x 117000. (Extratos de micrografias apresentadas na Tese de Doutoramento de M. M. Donato, 1999, Coimbra)

ANEXO III

O herbicida linurão inibe na mesma gama de concentrações a respiração da bactéria *G. stearothermophilus* e a respiração de mitocôndrias de fígado de rato

A Figura 1 mostra o efeito de linurão no consumo de oxigênio por protoplastos de *G. stearothermophilus*, utilizando NADH (10 mM) como substrato respiratório. A representação da velocidade de consumo de oxigênio na presença de concentrações crescentes de linurão, em percentagem do controlo (protoplastos a que não foi adicionado herbicida), permite determinar a concentração inibitória do herbicida (IC₅₀) que conduz a uma redução de 50% da atividade respiratória da bactéria. É de realçar que o valor de IC₅₀ encontrado (98 nmol/mg de proteína correspondente a 98 µM) é muito aproximado ao que foi obtido com o mesmo herbicida para o crescimento da bactéria (ver Anexo I).

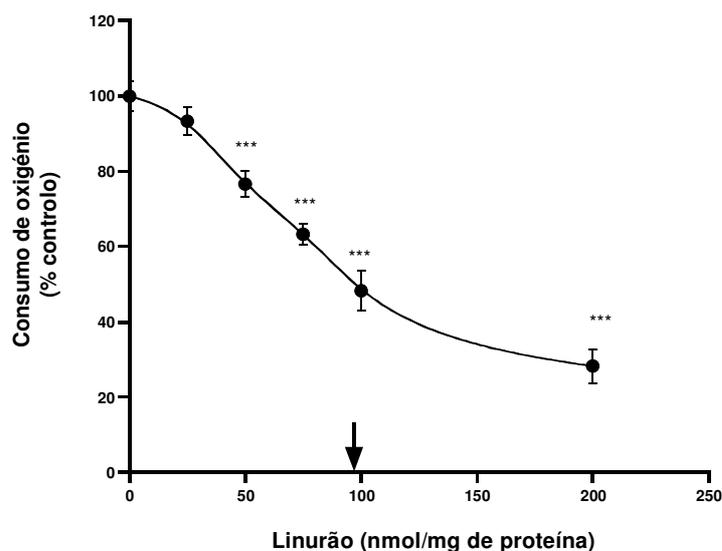


Figura 1 – Efeitos do linurão no consumo de oxigênio por protoplastos de *G. stearothermophilus* na presença de NADH (10 mM) como substrato respiratório. A concentração de linurão capaz de induzir uma redução de 50% na velocidade de consumo de oxigênio por protoplastos de *G. stearothermophilus* é igual a 98 nmol/mg de proteína (correspondente a 98 µM) (indicado pela seta). Os valores experimentais estão expressos em função do controlo e são a média ± desvio-padrão de 3 ensaios independentes. Os valores do consumo de oxigênio foram comparados com os valores do controlo (cultura de bactérias na ausência de linurão) utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p < 0,05 e ***p < 0,001

Este herbicida também inibiu a respiração de mitocôndrias de fígado de rato, afetando particularmente a respiração no estado 3, com conseqüente diminuição do índice de controlo respiratório (ICR) (Fig. 2). Os valores de IC₅₀ do herbicida determinados para ambos os parâmetros respiratórios (96 μ M para a velocidade de consumo de oxigénio pelas mitocôndrias em estado 3 e 79 μ M para o ICR) são assinalavelmente da mesma ordem de grandeza do valor de IC₅₀ referente à atividade respiratória de *G. stearotherophilus*.

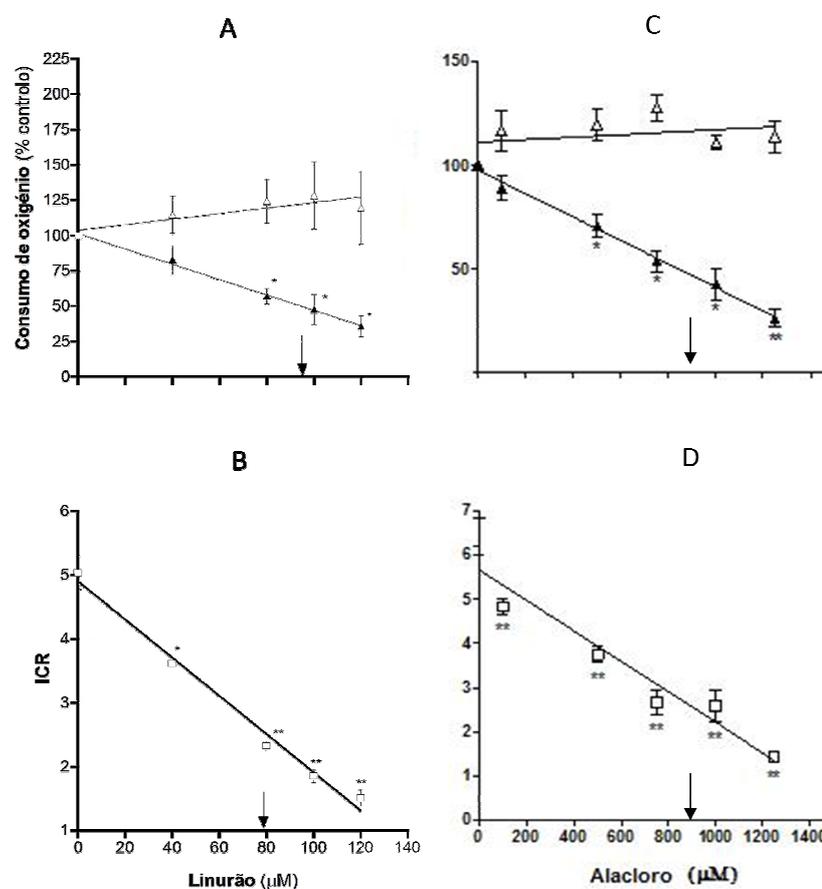


Figura 2 – Efeito da concentração de linurão (A,B) e de alacloro (C,D) no consumo de oxigénio na respiração em estado 3 (▲) e estado 4 (△) (A,C) e no índice de controlo respiratório (B,D) quando a respiração mitocondrial é suportada por glutamato/malato (complexo I). As suspensões mitocondriais (1,5 mg de proteína), em 1,5 ml de meio de reação (sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, KCl 20 mM, K₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,2) foram incubadas com os herbicidas durante 30 minutos, antes da adição de 5 mM glutamato/10 mM malato. A respiração em estado 3 foi induzida por adição de ADP (200 μ M). Cada valor experimental representa a média \pm desvio-padrão de 6 ensaios independentes (utilizando preparações mitocondriais diferentes). Os valores da velocidade de consumo de oxigénio e de ICR foram comparados com os valores dos respetivos controlos (mitocôndrias na ausência de herbicidas) utilizando o método “one-way ANOVA” com o teste “Student-Newman-Keuls”. *p < 0,05; **p < 0,01.

Anexos

Comparativamente com os valores correspondentes de IC₅₀ de alacloro (900 µM para a velocidade de consumo de oxigénio pelas mitocôndrias em estado 3 e para o ICR), é notória a maior toxicidade manifestada pelo linurão em relação a alacloro, à semelhança do que tinha sido observado no crescimento de *G. stearothermophilus* (ver Anexo I).