



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB)
CAMPUS DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANBIOTECNOLOGIA (PPG-NANO)

CAMILA GONÇALVES MOREIRA

OS DESAFIOS REGULATÓRIOS DA AVALIAÇÃO DE
SEGURANÇA BIOLÓGICA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM
SAÚDE DE BASE NANOTECNOLÓGICA:
UMA PROPOSIÇÃO REGULATÓRIA SOB UMA PERSPECTIVA
DE RISCO

BRASÍLIA/DF

2022

CAMILA GONÇALVES MOREIRA

**OS DESAFIOS REGULATÓRIOS DA AVALIAÇÃO DE
SEGURANÇA BIOLÓGICA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM
SAÚDE DE BASE NANOTECNOLÓGICA:
UMA PROPOSIÇÃO REGULATÓRIA SOB UMA PERSPECTIVA
DE RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Área de Concentração: Nanotoxicologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

BRASÍLIA/DF

2022

MOREIRA, Camila Gonçalves

Os Desafios Regulatórios da Avaliação de Segurança Biológica aplicada a Materiais de Uso em Saúde de base Nanotecnológica: Uma Proposição Regulatória sob uma Perspectiva de Risco / Camila Gonçalves Moreira. – Brasília, 2022. 233f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Disponível no Repositório Institucional da UnB.

CAMILA GONÇALVES MOREIRA

**OS DESAFIOS REGULATÓRIOS DA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA
BIOLÓGICA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE DE BASE
NANOTECNOLÓGICA:
UMA PROPOSIÇÃO REGULATÓRIA SOB UMA PERSPECTIVA DE RISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
(Presidente – Orientador)

Dr. José Mauro Granjeiro
(Membro Titular)

Dr. Itajaí Oliveira de Albuquerque
(Membro Titular)

Dra. Graziella Anselmo Joanitti
(Suplente)

BRASÍLIA/DF, 29 de abril de 2022.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

REITORA

Dra. Márcia Abrahão Moura

VICE-REITOR

Dr. Enrique Huelva Unternbäumen

DECANO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Dr. Lucio Remuzat Rennó Junior

DECANA DE PESQUISA E INOVAÇÃO

Dra. Maria Emília Machado Telles Walter

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Jaime Martins de Santana

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA**

Dr. Luiz Alexandre Muelhmann

AGRADECIMENTOS

Enalteço a Anvisa pela cultura de incentivo e oportunização de crescimento técnico-científico e profissional do seu corpo de servidores.

Agradeço, de modo especial, a minha Gerente Priscilla Nogueira Consiglierio e ao meu Gerente-Geral Leandro Rodrigues Pereira pelo apoio e incentivo às iniciativas de aprimoramento e desenvolvimento profissionais em áreas estratégicas e de interesse no diverso cenário de dispositivos médicos; bem como aos meus colegas de trabalho pelo carinho, suporte na manutenção das atividades da área nos meus períodos de ausência, e em especial a minha amiga Letícia, pelo tempo e escuta atenta aos meus processos de reflexão, construção e momentos de hesitação em meio à complexidade do tema proposto;

Ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de Brasília, aqui representado pelo meu Orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e por todo seu corpo docente e discente, registro meu profundo agradecimento pela acolhida e compartilhamento de conhecimentos e experiências tão diversos e ricos a minha formação durante essa experiência transformadora que foi a de um mestrado em um campo do conhecimento tão fascinante como o da Nanotecnologia;

Ao CNPq/CAPES por viabilizar a manutenção e continuidade das diversas linhas de pesquisa desenvolvidas no âmbito do ICB; e

A minha família, porto seguro e fonte inesgotável de incentivo e apoio as minhas escolhas e buscas por novos desafios. E de modo especial, a minha mãe Gêlva, aquela que primeiro me ensinou o valor e a importância da educação e as oportunidades que só ela abre ao desenvolvimento humano e social.

*When things are large, they are what they are.
When they are small, it's a different game: they
are what our measurements make them.*

(FRANKEL, F. C.; WHITESIDES, G. M., 2009)

MOREIRA, C.G. Os Desafios Regulatórios da Avaliação de Segurança Biológica aplicada a Materiais de Uso em Saúde de Base Nanotecnológica: Uma Proposição Regulatória sob uma Perspectiva de Risco. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 2022.

RESUMO

O avanço da Nanociência e Nanotecnologia nos últimos anos tem oportunizado o desenvolvimento e difusão de produtos a base de nanomateriais em diferentes campos do conhecimento, com destaque e crescente aplicação nas áreas das ciências médica e biológica (especialmente em Materiais de Uso em Saúde) – onde tem alcançado resultados promissores, mas também despertado preocupações a respeito da segurança biológica desses “nanoprodutos” e da competência regulatória para orientar sua avaliação sob uma perspectiva de risco – cenário que motivou o desenvolvimento do presente trabalho. Trata-se de pesquisa exploratória, baseada em abordagem teórica, alicerçada em extensa e sistemática revisão bibliográfica, delineada com o objetivo de construir um arcabouço teórico que possibilite uma compreensão ampliada sobre a Nanotecnologia e a Nanotoxicologia aplicadas a Materiais de Uso em Saúde constituídos por nanomateriais, sob o ponto de vista regulatório, inclusive no que tange aos desafios a ele relacionados; e estruturar uma proposição regulatória orientativa base à avaliação de segurança biológica dessa categoria de produtos, sob uma perspectiva de risco. Das 264 publicações incluídas e avaliadas, resultantes aos processos de identificação, triagem e elegibilidade aplicados à literatura recuperada por meio das estratégias de busca livre (66), estruturada (148) e cruzada (50), constatou-se que os desafios regulatórios enfrentados para determinação de um plano de avaliação de segurança biológica compreensivo, se confundem com os desafios técnicos, metodológicos e procedimentais enfrentados pela própria Nanociência, enquanto área do conhecimento emergente, marcada por produção científica vultosa, mas desprovida de sistematização para alcance de resultados mais objetivos, confiáveis e reprodutíveis que, não só subsidiem a compreensão de fenômenos físico-químicos e suas potenciais repercussões biológicas, mas a própria tomada de decisão (nos âmbitos científico, industrial e regulatório) quanto à aplicação e utilização seguras de nanomateriais em Materiais de Uso em Saúde. Com o intuito de proporcionar suporte técnico-científico ao planejamento e condução de avaliação nanotoxicológica mais adequada a essa categoria de produto, é que proposição regulatória baseada nas melhores práticas e orientações disponíveis, foi estruturada e apresentada. Contudo, reconhece-se que ainda há muito a se avançar rumo à racionalização, otimização e obtenção de avaliações de segurança biológica mais assertivas e eficientes, que

muito provavelmente apenas se tornarão tangíveis com o desenvolvimento de metodologias *in vitro* avançadas e computacionais validadas, associadas a iniciativas de colaboração entre os diferentes atores interessados na consolidação nanotecnológica segura em saúde.

PALAVRAS-CHAVE: nanotecnologia, nanotoxicologia, regulação, dispositivos médicos.

MOREIRA, C.G. The Regulatory Challenges of Biological Safety Assessment applied to Nanotechnology based Health Care Materials: A regulatory proposition from a risk perspective. Dissertation (Master's Degree in Nanoscience and Nanobiotechnology) – Institute of Biological Science, University of Brasília. Brasília, 2022.

ABSTRACT

The advancement of Nanoscience and Nanotechnology in recent years has provided opportunities for the development and dissemination of products based on nanomaterials in fields of knowledge, with emphasis and increasing application in the areas of medical and biological sciences (especially in Health Care Materials) where has achieved promising results, but also raised concerns about the biological safety of these “nanoproducts” and the regulatory competence to guide their assessment from a risk perspective – a scenario that motivated the development of this work. This is an exploratory research based on a theoretical approach built from an extensive and systematic literature review, designed with the objective of elaborating a theoretical framework that allows a broader understanding of Nanotechnology and Nanotoxicology applied to Health Care Materials constituted by nanomaterials, from a regulatory standpoint, including with regard to the challenges related to it; and to structure a regulatory guidance proposition based on the biological safety assessment of this category of products, from a risk perspective. Of the 264 publications included and evaluated, resulting from the identification, screening and eligibility processes applied to the literature retrieved through the nonstructured (66), structured (148) and manual (50) search strategies performed, it was found that the regulatory challenges faced in determining a plan of comprehensive biological safety assessment reflect the technical, methodological and procedural challenges faced by Nanoscience itself, as an emerging area of knowledge, marked by substantial scientific production, but lacking systematization to achieve more objective, reliable and reproducible materials that not only support the understanding of physical-chemical phenomena and their potential biological repercussions, but also the decision-making process (in the scientific, industrial and regulatory spheres) regarding the application and safe use of nanomaterials in Health Care Materials. In order to provide technical-scientific support for planning and conducting the most appropriate nanotoxicological assessment for this product category, a regulatory proposal based on the best practices and available guidelines was structured and presented. However, it is recognized that there is still much to be done towards, streamlining, optimizing and obtaining more assertive and efficient biological safety assessments, which will most likely only become tangible with the development of advanced *in vitro* and validated

computational methodologies, associated with collaborative initiatives between different actors interested in safe nanotechnology consolidation in health.

KEYWORDS: nanotechnology, nanotoxicology, regulation, medical devices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fundamentos para o Enquadramento de Dispositivos Médicos	32
Figura 2 - Classificação de Risco aplicável a Dispositivos Médicos	32
Figura 3 - Regras de Classificação para o Enquadramento Sanitário de Dispositivos Médicos	33
Figura 4 - Possibilidades de Aplicação da Nanotecnologia a Dispositivos Médicos	65
Figura 5 - Representação de algumas propriedades físico-químicas importantes à aplicação biomédica de nanomateriais	161
Figura 6 - Representação dos componentes MIRIBEL e destaque a alguns aspectos relevantes considerados no relato de processos de caracterização e experimentação em nanobiointeração	166

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultado <i>Mesh Terms</i>	56
Quadro 2 - Resultado <i>Emtree Terms</i>	58
Quadro 3 - Consolidação das Estratégias de Busca por Base de Dados.....	59
Quadro 4 - Categorização das publicações incluídas pela Revisão de Escopo por macrotemas	63
Quadro 5 - Consolidação de atributos físico-químicos aplicáveis ao processo de caracterização de nanomateriais contidos em Materiais de Uso em Saúde, segundo as normas técnicas ISO/TR 13014 (2012), ISO/TR 10993-22 (2017a) e documento SCENIHR (2015).....	80
Quadro 6 - Relação de Metodologias Analíticas aplicáveis à mensuração das principais características físico-químicas, segundo as normas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a).....	88
Quadro 7 – Quadro-Resumo de Desfechos Biológicos passíveis de análise no contexto de Avaliação.....	97
Quadro 8 – Relação de Metodologias Analíticas Aplicáveis à mensuração das principais características físico-químicas, segundo as normas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a) (previamente apresentado no subcapítulo Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração da Seção Resultados e Discussão).....	163
Quadro 9 - Quadro-Resumo de Desfechos Biológicos previstos pela norma ISO 10993-1 (2018a) a serem considerados na Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais sob uma Perspectiva de Gerenciamento de Risco (previamente apresentado no subcapítulo Avaliação de Segurança Biológica da Seção Resultados e Discussão)	170
Quadro 10 - Especificidades aplicáveis à avaliação de Materiais de Uso em Saúde que contenham, incorporem ou liberem nanomateriais.....	173

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1- Estratégias de Busca Bibliográfica	61
Fluxograma 2- Representação Esquemática do Processo de Gerenciamento de Risco previsto pela norma ISO 14971: 2019.....	156
Fluxograma 3 - Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde que contenham, sejam constituídos ou gerem nanomateriais ou nano-objetos, sob uma perspectiva de Gerenciamento de Risco	172

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ANSM – *Agence Nationale de Sécurité du Medicament et des Produits de Santé*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP – *Adverse Outcome Pathway*
AR – Agenda Regulatória
ASTM – *American Society for Testing and Materials*
BT – *Buehler Test*
BET – *Brunauer-Emmett-Teller*
CDRH – *Center for Devices and Radiological Health*
CIN – Comitê Interministerial de Nanotecnologia (âmbito do MCTI)
CIN – Comitê Interno de Nanotecnologia (âmbito da Anvisa)
CP – Consulta Pública
DLS – *Dynamic Light Scattering*
DOI – *Digital Object Identifier System*
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
EU MDR – *The European Union Medical Device Regulation*
FDA – *Food and Drug Administration*
FFDCA – *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*
FP5 – *5th Research Framework Programme*
FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
GPMT – *Guinea Pig Maximization Test*
GEMAT – Gerência de Tecnologia de Materiais de Uso em Saúde
HPT – *Human Patch Test*
IATA – *Integrated Approaches to Toxicity Assessment*
IANH – *The International Alliance for NanoEHS Harmonization*
IBN – Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia
ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*
ICP-OES – *Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*
IMDRF – *International Medical Device Regulators Forum*
ISO – *International Organization for Standardization*

JRC – *Join Research Center*

LAL – *Limulus Amebocyte Lysate* (Lisado de Amebócito *Limulus*)

LLNA – *Local Lymph Node Assay*

LPS – Lipopolissacarídeos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAT – *Monocyte Activation Test*

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MCTI – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações

MD – Ministério da Defesa

MDIC – Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

MEC – Ministério da Educação

MERCOSUL – Mercado Comum do Sul

MME – Ministério de Minas e Energia

MS – Ministério da Saúde

MEV – Microscopia |Eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFA – Microscopia de Força Atômica

MIRIBEL – *Minimum Information Reporting in Bio-Nano Experimental Literature*

MSV – Microscopia de Sonda de Varredura

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximeoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio

MVT – Microscopia de Varredura por Tunelamento

NANoREG – *A common European Approach to the Regulatory Testing of Nanomaterials*

NM – nanomaterial

NNI – *National Nanotechnology Initiative*

OCDE – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OSF – *Open Science Framework*

PCC – população, conceito e contexto

PL – Projeto de Lei

PLP – Projeto de Lei Complementar

PMA – *Premarket Approval*

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

REACH – *The European Legislation on Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*

SCENIHR – *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*

SPIONs – *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*

SisNANO – *Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias*

TC – *Technical Committee*

TGA – *Therapeutics Goods Administration*

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship*

XTT – (2, 3 – Bis- (2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil) -2H-Tetrazólio-5-Carboxanilida)

3R – *Replacement, Reduction and Refinement*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA NO CENÁRIO REGULATÓRIO E SUA INSERÇÃO NO CAMPO DE PRODUTOS MÉDICOS, COM ÊNFASE NA CATEGORIA MATERIAIS DE USO EM SAÚDE.....	22
1.1.1	Contextualização Teórica e Definições	22
1.1.2	Histórico da Regulação Sanitária no âmbito da Nanotecnologia nos Cenários Internacional e Nacional, com enfoque em Materiais de Uso em Saúde	27
1.1.2.1	União Europeia.....	28
1.1.2.2	Estados Unidos da América	34
1.1.2.3	Brasil	40
1.2	NANOTECNOLOGIA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE E AVALIAÇÃO NANOTOXICOLÓGICA SOB UMA PERSPECTIVA DE RISCO	47
2	OBJETIVOS	50
2.1	OBJETIVO GERAL.....	50
2.1.1	Objetivos Específicos.....	50
3	METODOLOGIA	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	PANORAMA SOBRE A NANOTECNOLOGIA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE E SEU PERFIL NO CENÁRIO REGULATÓRIO NACIONAL.....	64
4.2	AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA BIOLÓGICA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE DE BASE NANOTECNOLÓGICA, SOB UMA PERSPECTIVA DE RISCO	71
4.2.1	Nanotoxicologia Aplicada a Dispositivos Médicos	72
4.2.2	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração	75
4.2.3	Avaliação de Segurança Biológica	92
4.2.4	Avaliação de Riscos, Perigos e Tomada de Decisão	125
4.2.5	Regulação	131
4.2.6	Desafios Nanotoxicológicos e a Nanotoxicologia Preditiva.....	134
4.3	ANÁLISE E REFLEXÕES À LUZ DAS PERGUNTAS NORTEADORAS PROPOSTAS PELA REVISÃO DE ESCOPO.....	142

4.3.1	Como os desafios regulatórios relacionados à avaliação de segurança biológica aplicada a dispositivos médicos categorizados como materiais de uso em saúde de base nanotecnológica se diferenciam em relação ao contexto de análise regular?	143
4.3.2	Como esses desafios têm sido tratados? Como a avaliação de dispositivos médicos de base nanotecnológica tem avançado para superar os desafios e dificuldades inerentes a esse contexto?.....	147
5	PROPOSIÇÃO REGULATÓRIA	150
5.1	NANOTECNOLOGIA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE	153
5.1.1	Requisitos Essenciais de Segurança aplicáveis a Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, segundo a Resolução – RDC n° 546/2021	157
5.1.2	Caracterização físico-química e biológica do nanomaterial.....	159
5.1.3	Avaliação de Segurança Biológica sob uma Perspectiva de Risco.....	167
5.1.4	Reporte de Informações.....	178
6	CONCLUSÕES	181
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	184
8	REFERÊNCIAS	186
9	APÊNDICES	200
9.1	APÊNDICE A – PROTOCOLO DA REVISÃO DE ESCOPO.....	201
9.2	APÊNDICE B – MOTIVOS DE EXCLUSÃO DOS ARTIGOS SELECIONADOS PARA LEITURA NA ÍNTEGRA	204
9.3	APÊNDICE C – SUMÁRIO DOS ARTIGOS SELECIONADOS.....	221

1 INTRODUÇÃO

No final da década de 90, a Nanotecnologia, antes compreendida como uma tecnologia emergente, passou a ser reconhecida como uma tecnologia convergente e habilitadora-chave (“*key enabling technology*”) (BAUER et al., 2018; GEERTSMA et al., 2015; HALAMODA-KENZAOU et al., 2019; SCENIHR, 2015; XIARCHOS et al., 2020), frente ao seu grande potencial para resolução de desafios atuais e futuros nas mais diversas áreas do conhecimento em que sua utilização seja vislumbrada. Nesse contexto, países como Japão, China, Estados Unidos, bem como União Europeia assumiram destaque no suporte estratégico ao desenvolvimento desse novo campo (BAUER et al., 2018), que se tornou prioritário nos âmbitos de pesquisa, desenvolvimento e inovação.

Desde os anos 2000, a nanotecnologia tornou-se tema objeto de pesquisa e desenvolvimento, bem como alvo de debates regulatórios e de diversas iniciativas, especialmente, na Europa (BAUER et al., 2018). Seu rápido desenvolvimento direcionou ações regulatórias e científicas com o intuito de maximizar os benefícios advindos da nanotecnologia aplicada, assim como reduzir seus potenciais riscos à saúde.

Contudo, apesar do progressivo avanço científico em áreas como síntese, caracterização e toxicologia no âmbito da saúde humana, os dados até então obtidos mostram-se limitados e dispersos, fato que tem comprometido a compreensão dos riscos e impactos toxicológicos relacionados a essa tecnologia promissora e, por conseguinte, reduzido a velocidade de sua progressão em aplicações de finalidade terapêutica, por exemplo. Conjunção essa que tem motivado incertezas e preocupações de ordem sanitária e social relacionadas ao uso de nanomateriais e suas potenciais repercussões sobre a saúde humana e ambiental.

Nesse contexto, dispor de terminologia harmonizada e de definições bem estabelecidas constituiria o primeiro passo para determinação de uma compreensão mútua entre especialistas e outras partes interessadas (GOTTARDO et al., 2017; HALAMODA-KENZAOU et al., 2019), bem como para promoção de desenvolvimento e adoção de previsões regulatórias nano-específicas alinhadas. Por essa razão vários países, organizações e institutos têm trabalhado na elaboração de definições legais, científicas ou de trabalho relacionadas à nanotecnologia e a termos associados como “nanomateriais”, tomando como referência o tamanho do material, suas propriedades específicas ou a combinação de ambas (BAUER et al., 2018).

Todavia, apesar dos esforços depreendidos, persiste a ausência de padronização terminológica nessa área, e por conseguinte, de uma definição única e amplamente aceita entre

as jurisdições, fato que tem retardado a instituição de uma estrutura regulatória [convergente] pela União Europeia e outros países, que abarque aspectos específicos e relacionados à nanotecnologia e aos nanomateriais (BAUER et al., 2018) e; conseqüentemente, dificultado o cumprimento de requisitos regulatórios existentes por parte dos fabricantes de nanomateriais e/ou de produtos que os contenham (BOVERHOF et al., 2015).

Outros desafios enfrentados no âmbito da nanociência e nanotecnologia, com repercussão regulatória, relacionam-se aos nanomateriais – que, por sua versatilidade de aplicações e diversidade de propriedades físico-químicas combináveis, têm demandado da comunidade científica recursos e soluções, nem sempre disponíveis ou plenamente adaptáveis ao teor das análises requeridas para melhor compreensão de sua estrutura, características, perfil de interação e respostas deflagradas no cenário biológico. Realidade que tem suscitado discussões não apenas de ordem técnica e metodológica, mas sanitária, frente às preocupações e potenciais riscos biológicos relacionados ao uso desses materiais em produtos de uso humano sujeitos à regulação, tais como aqueles enquadrados como “produtos médicos”, na categoria Materiais de Uso em Saúde, que incluem uma expressiva e diversificada gama de produtos.

Nesse sentido, as lacunas de conhecimento no âmbito nanotoxicológico, refletidas na ausência de respostas definitivas a uma série de questões relacionadas à segurança biológica de nanomateriais aplicados a produtos de uso em saúde têm, invariavelmente, comprometido a análise de seu real risco à saúde humana – condição que tem orientado as autoridades regulatórias ao redor do globo à adoção de abordagens mais conservadoras e cautelosas na avaliação de dispositivos que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, frente as suas potenciais implicações à saúde.

Por esse motivo, abordagem do tipo caso a caso tem predominado entre as principais jurisdições, que têm regulado materiais de uso em saúde de base nanotecnológica a partir de requisitos de segurança e eficácia gerais estabelecidos pelas estruturas regulatórias existentes, sendo os aspectos nano-específicos contemplados a partir de avaliações adicionais requeridas com base no conhecimento científico disponível. Tal prática justifica-se frente à grande diversidade de nanomateriais (conhecidos e em desenvolvimento), à variabilidade de suas apresentações, propriedades e finalidades, bem como por suas inúmeras possibilidades de aplicação no cenário biológico – realidade que conforme evidenciado inviabilizaria qualquer tentativa bem-sucedida de regulamentação específica.

Por outro lado, aspecto importante e que não pode ser desconsiderado nesse contexto relaciona-se ao nível de maturidade técnico-científica alcançada pelo corpo técnico responsável por esse tipo de análise, que sem uma referência cientificamente embasada e minimamente

estruturada, poderia adicionar subjetividade e variabilidade ao padrão de análise regulatória aplicado a produtos de base nanotecnológica – situação plenamente contornável pela sistematização de diretrizes gerais, especialmente, voltadas à avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, por ser este um aspecto crítico no processo de regularização desse tipo de produto, e passível de um certo grau de padronização – oportuna e necessária tanto ao regulador quanto ao ente regulado.

Corroboram para a consecução desse processo, as importantes discussões travadas nos cenários acadêmico-científico, regulatório e de normatização, assim como os crescentes investimentos em pesquisa, com vistas a uma compreensão cada vez mais aprofundada dos processos de interação nano-biológicos e de seus potenciais impactos no organismo humano, com vistas ao aprimoramento das análises regulatórias, e por conseguinte, das decisões baseadas em risco (USFDA, 2007).

Frente ao exposto, e considerando-se, não apenas a ausência de arcabouço normativo e regulatório nacional, mas a necessidade de sistematização do conhecimento científico disponível relacionado à avaliação de segurança biológica sob uma perspectiva de risco; e sua aplicação ao cenário regulatório de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, é que se propôs o presente trabalho, que tem por finalidade se tornar um recurso teórico consistente e alinhado ao conhecimento corrente, que seja útil à estruturação de lógica regulatória pelo corpo técnico da Gerência de Tecnologia de Materiais de Uso em Saúde (Gemat) – enquanto área responsável pela regularização dessa categoria de produtos no âmbito da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) – mas também à comunidade acadêmica e ao setor regulado, como partes interessadas em desenvolver pesquisa orientada à ciência, desenvolvimento e inovação sob uma ótica regulatória (no que diz respeito ao rigor metodológico e completude de informações requeridas) no âmbito de produtos de uso em saúde de base nanotecnológica.

Por sua vertente essencialmente teórica, construída a partir de um modelo de pesquisa exploratório, esse trabalho foi estruturado a partir de sete seções, especificamente dedicadas à Contextualização Regulatória e à apresentação de Objetivos, Metodologia, Resultados e Discussão do trabalho, bem como da proposta de Diretrizes Regulatórias elaborada, seguida das Conclusões e Perspectivas Futuras sobre o tema no domínio regulatório. Pela extensão do conteúdo abordado, sua organização foi sistematizada sob a forma de capítulos e subcapítulos apresentados ao longo das principais seções elencadas.

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA NO CENÁRIO REGULATÓRIO E SUA INSERÇÃO NO CAMPO DE PRODUTOS MÉDICOS, COM ÊNFASE NA CATEGORIA MATERIAIS DE USO EM SAÚDE

1.1.1 Contextualização Teórica e Definições

Historicamente, a Nanotecnologia foi formalmente reconhecida como um campo viável de pesquisa, durante a lendária palestra proferida por Richard Feynman, intitulada “*There is Plenty of Room at the Bottom*”, realizada em 29 de dezembro de 1959, durante o encontro anual da Sociedade Americana de Física, no Instituto de Tecnologia da Califórnia (*CalTech*). Nela, Feynman considerou algumas das ideias e características-conceito ao que, anos mais tarde (mais especificamente, 1974), seria denominado “Nanotecnologia” pelo professor Norio Taniguchi, que a descreveu como “o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou por uma molécula” (CHARRIÈRE; DUNNING, 2014).

Já a noção de nanotecnologia como a habilidade de construir materiais, dispositivos e sistemas com precisão atômica, foi instituída por Eric Drexler, tendo essa sido expandida sob a ótica do Conselho Nacional de Tecnologia e Ciência dos Estados Unidos, que em manifestação sobre o tema asseverou que:

a essência da nanotecnologia é a habilidade de trabalhar a nível molecular, átomo por átomo, para criar estruturas maiores com, fundamentalmente, nova organização molecular. O objetivo é explorar essas propriedades ganhando o controle de estruturas e dispositivos em níveis atômicos, moleculares e supramoleculares e aprender a manufaturar e usar esses dispositivos com eficiência (ROCO, 1999 apud MANSOORI; SOELAIMAN, 2005, p. 1, tradução nossa)¹.

Nesse sentido, a promessa de uma ciência/tecnologia fundada em nanoescala (compreendida como o intervalo dimensional entre 1 e 100 nanômetros (nm)) passou a se basear

¹ No original: *The essence of nanotechnology is the ability to work at the molecular level, atom by atom, to create large structures with fundamentally new molecular organization. The aim is to exploit these properties by gaining control of structures and devices at atomic, molecular, and supramolecular levels and to learn to efficiently manufacture and use these devices* (ROCO, 1999 apud MANSOORI; SOELAIMAN, 2005, p. 1).

no fato demonstrado de que, materiais nessa proporção apresentariam propriedades (químicas, elétricas, magnéticas, mecânicas, ópticas) muito diferentes dos materiais a granel (*in bulk*) – sendo algumas dessas propriedades, de certo modo, intermediárias entre aquelas manifestas pelos menores elementos (átomos e moléculas) dos quais eles poderiam ser constituídos e aquelas apresentadas por materiais macroscópicos – condição que despertou interesse e conferiu visibilidade à Nanotecnologia, frente à possibilidade que ela nos proporcionaria de controlar e manipular nanoestruturas, e assim, explorar novas propriedades físicas, biológicas e químicas de sistemas que, em escala de tamanho, se localizariam entre átomos individuais, moléculas e materiais a granel (MANSOORI; SOELAIMAN, 2005).

Nessa mesma perspectiva, o documento *Nanociência e Nanotecnologias; Oportunidades e Incertezas (Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties)*, publicado pela Sociedade Real e Academia Real de Engenharia (*The Royal Society & The Royal Academy of Engineering*), reconheceu na nanociência e na nanotecnologia um enorme potencial para trazer benefícios a muitas áreas de pesquisa e aplicação, assim como para atrair investimentos crescentes de governos e negócios em muitas partes do mundo; sem contudo desconsiderar as preocupações advindas dos novos desafios impostos por esse novo campo, principalmente, no que concerne às questões de segurança relacionadas a sua utilização e aos domínios ético e/ou regulatório envolvidos (DOWLING et al., 2004).

Por se tratar de documento dedicado à discussão de dois conceitos-chave nesse novo campo objeto de interesse, nele foram cunhadas as definições de referência para os termos Nanociência – designado como “o estudo de fenômenos e manipulação de materiais em escalas atômicas, moleculares e macromoleculares, onde as propriedades diferem significativamente daquelas em uma escala maior”² e Nanotecnologia – descrito como “o projeto, a caracterização, a produção e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, a partir do controle de forma e tamanho em escala nanométrica”³ (DOWLING et al., 2004) – que apesar de bem estabelecidos, têm sido progressivamente aprimorados com o avanço do conhecimento, ainda hoje em construção.

Outro termo importante no âmbito de aplicação da nanotecnologia, por se constituir como unidade base à concepção de diversos produtos baseados nessa tecnologia, é aquele referenciado como nanomaterial – definido sob uma ótica normativa como “material com

² No original: *Nanoscience is the study of phenomena and manipulation of materials at atomic, molecular and macromolecular scales, where properties differ significantly from those at a large scale* (DOWLING et al., 2004, p. 5).

³ No original: *Nanotechnologies are the design, characterisation, production and application of structures, devices and systems by controlling shape and size at nanometer scale* (DOWLING et al., 2004, p. 5).

qualquer dimensão externa na nanoescala ou que possua estrutura interna ou estrutura de superfície na nanoescala”⁴, conforme disposição constante na norma ISO/TR 13014 (adaptada da norma ISO/TS 80004-1) (ISO, 2012).

Por se tratar de terminologia abrangente, nela se encontram abarcados dois outros termos “nano-objeto”⁵ e “material nanoestruturado”⁶, sendo o primeiro compreendido como “pequena parte/pedacço de material com uma, duas ou três dimensões externas na nanoescala” e o segundo, como “material de nanoestrutura interna ou nanoestrutura de superfície”, nos termos da mesma norma técnica (ISO, 2012).

Tomando-se como referência a intencionalidade aplicada à obtenção e utilização desses nanomateriais para manufatura de produtos de base nanotecnológica com características e propriedades específicas para a área de aplicação desejada, é que se insere o conceito de nanomaterial engenheirado ou manufaturado – descrito como material intencionalmente fabricado dentro do intervalo dimensional característico de 1 a 100 nm e, que apresente propriedades não compartilhadas por materiais fora da nanoescala, de mesma composição química (AUFFAN et al., 2009). Por seu propósito, essa classe de nanomaterial tem possibilitado avanços tecnológicos importantes no campo médico e industrial, motivo pelo qual tem se destacado em relação a nanomateriais de origem natural e se tornado objeto de grande interesse e estudo nos últimos anos.

Nessa seara, também se inserem os nanobiomateriais engenheirados [em geral, descritos como materiais nanoestruturados para aplicações biomédicas], que representam significativo avanço no campo de produtos baseados em biotecnologia, por oferecerem perspectivas promissoras a dispositivos médicos e medicamentos de terapia avançada, e assim viabilizarem uma variedade de novas opções de tratamento devido as suas propriedades nano-específicas (JAGIELLO et al., 2017). Advento fundamental ao avanço da nanotecnologia no âmbito da saúde, onde tem sido reconhecida e identificada como Nanomedicina, por viabilizar o uso de nanomateriais, nanodispositivos ou nanoestruturas para diagnóstico, reparo, monitoramento, prevenção, controle e tratamento de doenças ao nível molecular, suprimindo assim necessidades em saúde altamente específicas (HARRIS, 2009; TINKLE et al., 2014).

⁴ No original: *Nanomaterial: material with any external dimension in the nanoscale or having internal structure or surface structure in the nanoscale* (ISO, 2012, p. 4).

⁵ No original: *Nano-object: discrete piece of material with one, two or three external dimensions in the nanoscale* (ISO, 2012, p. 4).

⁶ No original: *Nanostructured material: material having internal nanostructure or surface nanostructure* (ISO, 2012, p. 4).

Nesse cenário, substancial número de abordagens baseadas no emprego de materiais em nanoescala, incorporados a dispositivos médicos, ou biomateriais contendo nanopartículas como um dos componentes para desenvolvimento de funcionalidades únicas requeridas por sistemas biomédicos, como àqueles projetados para liberação de drogas ou para uso em implantes, por exemplo, têm sido empregadas (JAGIELLO et al., 2017). Realidade que tem conferido à Nanomedicina *status* promissor, frente à possibilidade de incorporação de estruturas em nanoescala com novas propriedades físico-químicas e biológicas para obtenção de produtos medicinais e dispositivos médicos mais seguros e eficazes; o que apesar de se constituir como oportunidade, também pode resultar em riscos (SCENIHR, 2015).

Especificamente no âmbito de dispositivos médicos, a aplicação da nanotecnologia tem se tornado crescente e habilitadora, por proporcionar recursos inovadores às diversas especialidades médicas (GEERTSMA et al., 2015). Por se tratar de termo geral e de alcance estrito aos ambientes regulatório e da indústria de produtos médico-hospitalares, sua conceituação se faz necessária. Em assim sendo, nos termos do disposto pela Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 185/2001, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), entende-se como produto médico:

produto para saúde, tal como equipamento, aparelho, material, artigo ou sistema de uso ou aplicação médica, odontológica ou laboratorial, destinado à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utiliza meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos podendo, entretanto, ser auxiliado em suas funções por tais meios (BRASIL, 2001).

Trata-se de definição abrangente e alinhada às definições estabelecidas por outras agências reguladoras ao redor do globo. Sob seu escopo, encontram-se duas categorias de produtos, os ditos “materiais de uso em saúde” (que incluem desde produtos mais simples como agulhas, curativos, lentes de contato até dispositivos mais complexos como cateteres de acesso venoso central e implantes, tais como os cardiovasculares e ortopédicos, por exemplo) e; os enquadrados como “equipamentos médico-hospitalares” – sendo apenas os primeiros, objeto de interesse e aprofundamento no presente trabalho, por abrangerem um grupo significativo de produtos com aplicações clínicas diversas, sujeitos a processos de aprimoramento incremental constantes (ou mesmo, de inovação radical/disruptiva), viabilizados pelo uso de novas

tecnologias, incluindo-se aquelas vinculadas à chamada Quarta Revolução Industrial, dentre as quais destaca-se a Nanotecnologia.

Considerando-se o disposto pela norma técnica de referência ISO/TR 10993-22, enquanto diretriz aplicável a nanomateriais no contexto de avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos, verifica-se que a aplicação da nanotecnologia no âmbito de materiais de uso em saúde ocorre, essencialmente, por meio da utilização e incorporação de nanomateriais a esses produtos, apresentados nesse cenário sob quatro formas:

- nanoestruturas de superfície;
- nano-objetos ligados ou incorporados ao interior do produto médico, sem a intenção de serem liberados;
- nano-objetos/nanoestruturas na superfície ou no interior do produto médico, com liberação esperada ou intencional a partir desse dispositivo; e
- nano-objetos liberados do produto médico como produto de degradação, desgaste ou resultantes a processos de tratamento mecânico (ISO, 2017a).

Quanto ao último tipo mencionado, cumpre pontuar que se trata de particularidade inerente a dispositivos médicos, e por conseguinte, aos materiais de uso em saúde, já que esse tipo de nano-objeto, identificado na literatura como nanomaterial incidental, é gerado como subproduto não-intencional de um processo (YANG et al., 2020; ISO, 2017a), o que pode ocorrer tanto em produtos que contenham nanomateriais como naqueles que não os possuam.

Sob essa perspectiva e, tomando-se como ponto de partida a grande diversidade de materiais de uso em saúde em termos de aplicação, finalidade, características e uso clínico pretendido, assim como as diferentes formas de apresentação dos nanomateriais nele contidos – evidencia-se que num contexto de análise regulatória e normativa aplicada a materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, tanto os nanomateriais incorporados enquanto tecnologia como aqueles gerados ao longo do ciclo de vida do produto (inclusive de modo incidental) devem ser considerados e avaliados quanto aos seus eventuais riscos biológicos e impactos à saúde humana. De modo que conhecidos, esses riscos possam ser estimados, e caso necessário, minimizados pela adoção de medidas de controle, para que relação risco-benefício favorável ao emprego da nanotecnologia e utilização segura do dispositivo possa ser estabelecida.

Contudo, muitas ainda são as limitações observadas não apenas nos campos normativo e regulatório relacionados à avaliação de segurança biológica sob uma perspectiva de risco de forma geral, que conforme ponderado por Jagiello et al. (2017) vão além da insuficiência das regulamentações existentes para demonstrar a segurança de dispositivos médicos que

contenham componentes nanotecnológicos promissores, já que a escassez de técnicas adequadas e específicas para caracterização e avaliação de biocompatibilidade de materiais em nanoescala, e a ausência de um processo de tomada de decisão estruturado para uso em associação à gestão de risco no contexto de uso desse tipo de material também corroboram para a manutenção de um cenário marcado por incertezas, e necessários avanços.

Nesse sentido, compreender o panorama regulatório em que a nanotecnologia se insere, e como produtos de base nanotecnológica sujeitos à regulação sanitária, com enfoque naqueles pertencentes à categoria de materiais de uso em saúde, têm sido avaliados sob a égide das duas principais autoridades regulatórias ao redor do globo – Europa e Estados Unidos, enquanto jurisdições que mais avançaram nesse campo, em termos de planejamento, esforços e investimentos em pesquisa, inclusive para melhor compreensão de potenciais riscos relacionados à exposição humana e ambiental (WARHEIT, 2018) – mostra-se relevante e necessário, inclusive, à contextualização e delineamento do panorama regulatório nacional.

1.1.2 Histórico da Regulação Sanitária no âmbito da Nanotecnologia nos Cenários Internacional e Nacional, com enfoque em Materiais de Uso em Saúde

Tomando-se como referencial o recorte das jurisdições que, ao longo dos anos, mais têm investido e contribuído para o progresso e desenvolvimento da nanociência e da nanotecnologia no mundo, breve contextualização sobre o seu processo de internalização e amadurecimento científico e regulatório nessa área será aqui apresentado, na tentativa de explicitar como esse complexo e pouco conhecido cenário tem mobilizado investimentos e direcionado esforços à obtenção de novos conhecimentos, e à superação de limitações técnicas, que viabilizem avanços mais expressivos e sólidos no que tange, especialmente, à segurança de uso da nanotecnologia em produtos de uso humano sujeitos à regulação sanitária.

1.1.2.1 União Europeia

A primeira menção à nanotecnologia em um documento estratégico no âmbito da União Europeia se deu por meio do 5º Programa-Quadro de Pesquisa (*5th Research Framework Programme – FP5*) da Comissão Europeia, elaborado para o período de 1998-2002, com vistas à articulação de prioridades em pesquisa, atividades de desenvolvimento e demonstração tecnológica no âmbito dessa região (PAVLICEK; ROSE; GAZSÓ, 2019).

Pode-se dizer que, desde 2002, a Europa tem direcionado seus esforços a processos de atualização relacionados às terminologias voltadas à Nanociência e à Nanotecnologia; bem como à instituição de uma definição formal base, referente ao tema e ao aprimoramento dos processos de avaliação e gerenciamento de riscos aplicados a nanoproductos (RICCARDI; SANTOS; GUASTALDI, 2015, p. 209).

Em 2005, a Comissão Europeia formulou uma série de ações interconectadas para implementação de uma abordagem segura, integrada e responsável para a nanociência e nanotecnologia (PAVLICEK; ROSE; GAZSÓ, 2019). O documento Rumo à Estratégia Europeia de Nanotecnologia⁷ marcou o início dessa abordagem compreensiva e estratégica em nanociência e nanotecnologias na Europa, colocando o tema na agenda institucional da Comissão Europeia.

Desde então, a questão sobre *se* e *como* regular nanomateriais está em andamento na União Europeia. No início deste século, houve uma grande diversidade de posicionamentos sobre essa questão – que foram desde considerações sobre a inexistência de diferenças entre os nanomateriais e outras substâncias químicas, justificando assim a desnecessidade de provisão legal específica, até apelos de suspensão do uso e desenvolvimento desses materiais (BAUER et al., 2018). O fim desse imbróglio se deu apenas em 2008, com a publicação de um comunicado sobre a suficiência da legislação existente em abarcar os potenciais riscos à saúde, segurança e meio ambiente advindos dos nanomateriais, apesar da ausência de qualquer menção ao termo “nanomaterial” na legislação da União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

A partir de 2009, por demanda do Parlamento Europeu, foi iniciado o processo de instituição de uma definição abrangente e cientificamente embasada para o termo “nanomaterial” na legislação da União Europeia, bem como de uma espécie de “nano registro”

⁷ No original: *Towards European Strategy for Nanotechnology*

europeu, para disponibilização de informações sobre nanomateriais e seu uso em produtos comercializados no mercado europeu (PAVLICEK; ROSE; GAZSÓ, 2019).

Em 2011, a Comissão Europeia publicou uma recomendação contendo a definição de nanomaterial, tendo essa sido instituída em resposta ao crescente uso de disposições legislativas específicas sobre nanomateriais e à necessidade de harmonização da terminologia entre os diferentes setores. Ademais, nessa mesma época, a Comissão posicionou-se pela não necessidade de registro dos nanomateriais em toda a União Europeia (PAVLICEK; ROSE; GAZSÓ, 2019).

A definição estabelecida pela Comissão Europeia foi baseada em disposições provenientes de duas entidades de apoio científico e regulatório à União Europeia – *The European Commission Joint Research Center – JRC* e *The Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks – SCENIHR* (SOARES et al., 2018). Tendo essa sido apresentada nos seguintes termos:

Nanomaterial: material manufaturado, incidental ou natural contendo partículas em um estado não ligado ou como um agregado ou aglomerado, em que 50% ou mais das partículas em número de distribuição de tamanho, em uma ou mais dimensões externas, estejam no intervalo de tamanho entre 1-100 nm. Nos casos de preocupação ambiental, de saúde, segurança ou competitiva, o limite para o número de distribuição de tamanho de 50% pode ser substituído por um limite entre 1 e 50%. Estruturas com uma ou mais dimensões externas abaixo de 1nm, como fulerenos, flocos de grafeno e nanotubos de carbono de parede única, devem ser considerados como nanomateriais. Materiais com área de superfície por volume superior a $60\text{m}^2/\text{cm}^3$ também estão incluídos (EUROPEAN COMMISSION, 2011, p. 3, tradução nossa).⁸

Nessa definição, são colocados em evidência três aspectos fundamentais para identificação da presença de um nanomaterial, quais sejam: o tamanho, a distribuição de tamanho das partículas e a área de superfície. (BOVERHOF et al., 2015; EUROPEAN COMMISSION, 2011; MUSAZZI et al., 2017)

⁸ No original: '*Nanomaterial*' means a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm-100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness the number size distribution threshold of 50 % may be replaced by a threshold between 1 and 50 %. Fullerenes, graphene flakes and single wall carbon nanotubes with one or more external dimensions below 1 nm should be considered as nanomaterials. A material should be considered as falling under [this] definition where the specific surface area by volume of the material is greater than $60\text{ m}^2/\text{cm}^3$ (EUROPEAN COMMISSION, 2011, p. 3).

Trata-se de conceito recomendado em termos legais e de política pública no âmbito da União Europeia (MUSAZZI et al., 2017). Com base nele, os organismos regulatórios europeus têm estabelecido suas próprias diretrizes para apoiar o desenvolvimento de produtos nanotecnológicos nas suas mais diversas áreas de aplicação. Em assim sendo, ele é usado como referência, apenas, para determinar se um material é ou não considerado nanomaterial, não sendo suficiente a sua classificação em termos de segurança ou periculosidade. Sob essa perspectiva, a Comissão Europeia defende que a referida definição seja utilizada como uma diretriz a estruturas políticas e regulatórias adicionais relacionadas às avaliações de qualidade, segurança, eficácia, bem como de risco (BOVERHOF et al., 2015).

Cumprir pontuar que, ao longo da última década, revisão quanto à aplicabilidade das estruturas regulatórias existentes à avaliação de nanomateriais foi realizada pela Comissão Europeia, com vistas à proposição de eventuais adaptações às regulamentações de setores importantes (BAUER et al., 2018).

Contexto que conferiu à Europa, a posição de primeira jurisdição no mundo a fornecer disposições legais específicas para atender às preocupações de saúde e segurança relacionadas aos nanomateriais. Atualmente, a definição de nanomateriais encontra-se explicitamente disposta em diversos regulamentos específicos (conforme o tipo de nanomaterial, aplicação e setor industrial – (MUSAZZI et al., 2017)), tais como os de Cosméticos, Alimentos, Biocidas e Dispositivos Médicos – onde guarda algumas especificidades relacionadas à aplicabilidade de cada uma dessas categorias de produto – além de também estar contemplada, no regulamento de substâncias químicas conhecido como *REACH* (*The European legislation on Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) (BAUER et al., 2018), pedra angular na regulação europeia.

Apesar de recomendada, a definição de nanomaterial disposta na Recomendação de 2011 foi adotada apenas por algumas legislações específicas mais recentes, fato que tem contribuído para a falta de harmonização e persistente diversidade de definições entre os diferentes setores regulatórios na Europa, condição que invariavelmente dificulta o devido cumprimento regulatório nessa jurisdição, por fabricantes envolvidos em diferentes segmentos produtivos, assim como contribui para a manutenção de um cenário regulatório global disperso no âmbito da Nanotecnologia.

Ademais, cabe considerar que a referida Recomendação se encontra sob revisão desde 2014, com apoio do *JRC*, tendo esse processo como propósito principal tornar seu texto mais claro (pelo esclarecimento de alguns pontos) e aplicável, enquanto referência transversal coerente e implementável entre as diferentes legislações, de modo a assim, assegurar que um

material considerado como nanomaterial em um setor seja também tratado como tal, quando utilizado em outro setor. Antes de sua conclusão, planeja-se uma consulta pública aberta para contribuições e delimitação de escopo dessa atualização (COMMISSION, 2020).

Especificamente, no que tange à regulação de dispositivos médicos (*The European Union Medical Device Regulation – EU MDR 2017/745*), essa foi atualizada e publicada em 2017, tendo se tornado, a partir de então, o único regulamento na área da saúde a conter disposições nano-específicas, segundo Rauscher; Rasmussen; Sokull-Klüttgen (2017).

Tornado vigente em maio de 2021, dentre outros aspectos, nele estão contempladas algumas definições e a instituição de regra específica para o enquadramento de dispositivos médicos que contenham nanomateriais. Dentre as definições incorporadas destaca-se aquela relacionada a nanomaterial, instituída com base na definição disposta pela Recomendação da Comissão 2011/696/EU (e portanto, não idêntica a ela), conforme a seguir transcrito:

Material natural, incidental ou manufaturado que contém partículas em estado não ligado ou sob a forma de agregado ou aglomerado, em que 50% ou mais do número de partículas apresente distribuição de tamanho dentro do intervalo de 1 a 100 nm, em uma ou mais de suas dimensões externas. Fullerenos, flocos de grafeno e nanotubos de carbono de parede simples com uma ou mais dimensões externas inferiores a 1 nm também são considerados nanomateriais (EUROPEAN UNION, 2017, p. 17, tradução nossa).⁹

Quanto ao enquadramento sanitário aplicado a dispositivos médicos que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais (incluindo-se aqueles compreendidos como materiais de uso em saúde), esse segue a lógica geral para classificação de risco definida pelo *MDR*, que com base em três critérios-chave (anatomia, nível de invasividade e tempo de contato), norteados por princípios básicos (finalidade, consequência das falhas e tecnologia associada) – ilustrados pela Figura 1, estabelece o enquadramento sanitário a ser atribuído ao produto objeto de interesse, em termos de risco.

⁹ No original: ‘*Nanomaterial*’ means a natural, incidental or manufactured material containing particles in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1-100 nm. Fullerenes, graphene flakes and single-wall carbon nanotubes with one or more external dimensions below 1 nm shall also be deemed to be nanomaterials (EUROPEAN UNION, 2017).

Figura 1 – Fundamentos para o Enquadramento de Dispositivos Médicos



Fonte: Adaptado de (ABDI, 2011, p. 48).

Nesse sentido, quatro são as possíveis classes de risco a serem adotadas nesse processo, categorizadas de modo crescente e gradativo como: I – Baixo Risco; IIa – Médio Risco; IIb – Alto Risco e III – Máximo Risco, tal como representado pela Figura 2.

Figura 2 - Classificação de Risco aplicável a Dispositivos Médicos



Fonte: Adaptado de (DENMARK, 2020).

Outro elemento importante no processo de enquadramento sanitário, diz respeito à aplicação das regras de classificação, determinadas pela finalidade pretendida do dispositivo e

agrupadas segundo quatro escopos definidos: Dispositivos Médicos não Invasivos (Regras de 1 a 4), Dispositivos Médicos Invasivos (Regras de 5 a 8), Dispositivos Médicos Ativos (Regras de 9 a 13) e Regras Especiais (Regras 14 a 22) – conforme representado pela Figura 3.

Figura 3 - Regras de Classificação para o Enquadramento Sanitário de Dispositivos Médicos



Fonte: Adaptado de ABDI (2011, p. 50)

Nesses termos, todos os dispositivos que incorporem ou sejam constituídos por nanomateriais serão enquadrados na Regra 19, sendo sua classe de risco estabelecida conforme o potencial de exposição interna do nanomaterial contido no produto, categorizado nos seguintes termos: Potencial de Exposição Interna Negligenciável – médio risco (IIa); Baixo Potencial de Exposição Interna – alto risco (IIb) ou; Médio ou Alto Potencial de Exposição Interna – máximo risco (III) (EUROPEAN UNION, 2017). Contudo, segundo Halamoda-Kenzaoui et al. (2019), não há clareza quanto ao significado e entendimento a ser aplicado para determinação do potencial de exposição interna previsto no regulamento europeu, que não indica qualquer abordagem metodológica para avaliação de risco para avaliação da exposição interna (MUSAZZI et al., 2017) – condição que dificulta a adoção de classificação de risco inequívoca ao dispositivo objeto de interesse, impactando não apenas a correta aplicabilidade do regulamento, mas sobretudo seus desdobramentos regulatórios, em termos de requisitos exigidos, caso categorização incorreta e menos rigorosa seja adotada.

Cumprir pontuar que, apesar de não haver clareza quanto à classificação de risco conferida ao potencial de exposição interna de nanomateriais contidos em dispositivos médicos

(já estabelecido como médio, mesmo em cenários de exposição negligenciável) essa pode estar relacionada ao princípio da precaução e à necessária adoção de uma abordagem mais cautelosa, frente às incertezas e persistentes lacunas de conhecimento no âmbito da nanotoxicologia e nanociência aplicada no âmbito da saúde.

De acordo com o documento Diretrizes sobre a Determinação dos Potenciais Efeitos sobre a Saúde de Nanomateriais Usados em Dispositivos Médicos (*Guidance on the Determination of Potential Health Effects of Nanomaterials used in Medical Devices*), publicado pelo SCENIHR (2015), e as disposições constantes nas normas ISO 10993-1 (2018a) e ISO/TR 10993-22 (2017a), esse potencial de exposição interna deve levar em consideração, não apenas a anatomia alcançada pelo dispositivo (local de aplicação/posicionamento), mas o nível de seu contato (invasividade) e tempo de duração desse contato (limitado – por até 24h; prolongado – de 24h a 30 dias ou permanente – acima de 30 dias); mas também, a forma de apresentação do nanomaterial no dispositivo médico (se livre, fixo ou incorporado a sua matriz) e sua sujeição a desprendimento ao longo do tempo e/ou liberação, como resultado de processamento, de processos de degradação ou desgaste do dispositivo médico que incorpore ou seja constituído por nanomaterial.

Portanto, tomando-se o Regulamento Europeu (*EU MDR 2017/745*) como referência, pode-se dizer que dispositivos médicos, assim como materiais de uso em saúde, que incorporem nanomateriais, cujo potencial de exposição interna seja classificado como médio ou alto, devem ser submetidos a procedimentos de avaliação da segurança e eficácia mais rigorosos, por representarem maior risco à saúde do usuário.

1.1.2.2 Estados Unidos da América

Em 2001, foi lançado um programa multiagência nos Estados Unidos, denominado Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (*The US National Nanotechnology Initiative – NNI*), voltado à pesquisa e desenvolvimento multidisciplinar da Nanotecnologia pelo governo federal dos Estados Unidos.

Por se tratar de iniciativa colaborativa entre 20 agências federais independentes e departamentos do governo americano, a *NNI* foi criada com o intuito de estruturar metas, prioridades e estratégias compartilhadas no âmbito da Nanotecnologia. Por isso, pesquisas

relacionadas à Nanotecnologia nas áreas ambiental, de saúde e segurança tornaram-se componentes essenciais na estrutura coordenada pela *NNI*.

A definição de Nanotecnologia, como “o entendimento e o controle da matéria em dimensões entre aproximadamente 1 e 100 nm, onde fenômenos únicos permitem novas aplicações”¹⁰ – foi estabelecida no âmbito dessa Iniciativa (USFDA, 2014a).

Em 2006, com vistas a enfrentar os desafios colocados pela Nanotecnologia na área da saúde, a Agência Reguladora Norte-Americana (*Food and Drug Administration – FDA*) instaurou uma força tarefa para determinação de abordagens regulatórias que incentivassem o desenvolvimento de produtos nanotecnológicos sujeitos à regulação sanitária, que fossem inovadores, seguros e eficazes. Tendo dela resultado um relatório, divulgado em 2007 “Nanotecnologia – Um Relatório da Força Tarefa em Nanotecnologia da *FDA*”¹¹, que concluiu pela não necessidade de regulamentação nova e específica para nanotecnologia, tendo também fornecido inúmeras recomendações a respeito do tema.

Contudo, algumas questões levantadas pela Força Tarefa permaneceram sem resposta, tendo-se recomendado em seu próprio relatório a elaboração de diretrizes mais específicas para abordagens pontuais, orientação, por vezes não endereçada, até a presente data.

Embora a *FDA* não tenha estabelecido uma definição regulatória para “nanotecnologia”, “nanomaterial”, “nanoescala” ou outro termo relacionado, foram identificados aspectos a serem considerados ao decidir se um produto regulado pela Agência contém nanomateriais ou envolve a aplicação de Nanotecnologia, conforme disposto pelo documento Diretrizes para a Indústria – Considerações se um produto regulado pela *FDA* envolve a aplicação de Nanotecnologia¹² (USFDA, 2014a), tal como a seguir apresentado:

- Se um material ou produto final é projetado para ter pelo menos uma dimensão externa ou uma estrutura interna ou de superfície dentro do intervalo da nanoescala (aproximadamente 1 a 100 nm); e

- Se um material ou produto final é projetado para exibir propriedades ou fenômenos, incluindo propriedades físicas ou químicas ou efeitos biológicos, atribuíveis as suas dimensões, mesmo que essas estejam fora da faixa nanométrica, até um micrômetro (1000 nm). Isso porque, comportamentos biológicos e propriedades físico-químicas relevantes à avaliação de segurança

¹⁰ No original: *The understanding and control of matter at dimensions between approximately 1 and 100 nanometers, where unique phenomena enable novel applications* (THE UNITED STATES OF AMERICA, 2011).

¹¹ No original: *Nanotechnology – A report of the U.S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force*.

¹² No original: *Guidance for Industry – Considering whether an FDA-Regulated Product involves the Application of Nanotechnology*.

têm sido observados em dimensões fora do intervalo de nanoescala convencionalmente estabelecido entre 1 e 100 nm (USFDA, 2014a).

Faz-se oportuno pontuar que, essas considerações aplicam-se não apenas a produtos novos, mas também a situações de mudança de produtos já aprovados, em que o processo de manufatura possa alterar as dimensões, propriedades ou efeitos de um produto regulado ou quaisquer de suas partes constituintes (USFDA, 2007).

Em 2009, a equipe sênior da *FDA* reafirmou a posição da Agência de que não seria necessária uma estrutura regulatória totalmente nova para a nanotecnologia, já que produtos dela provenientes, apresentariam desafios semelhantes àqueles impostos por outras tecnologias emergentes. Contudo, a *FDA* continuaria a acompanhar as pesquisas e questões emergentes relacionadas à nanotecnologia. Na ocasião, essa mesma equipe também afirmou que o relatório da Força Tarefa de 2007 permaneceria como referência sobre o tema, não havendo planos de atualização ou emissão de regulamentos específicos para nanotecnologia (DUVALL, 2012).

Em 2011, o Escritório Executivo do Presidente (*The Executive Office of President*) estabeleceu um conjunto de princípios relacionados à regulamentação e supervisão de tecnologias emergentes, com menção específica à nanotecnologia, baseados na integridade científica, participação do público, comunicação, conscientização de benefícios e custos, flexibilidade, avaliação e gerenciamento de risco, coordenação entre agências e cooperação internacional, bem como orientações detalhadas sobre regulação de tecnologias emergentes (DUVALL, 2012).

Conforme disposto pelo documento *Regulação da Nanotecnologia* publicado pela *FDA* (*FDA Regulation of Nanotechnology*), esses princípios foram reiterados e explicados em um segundo conjunto de princípios específicos para a nanotecnologia, cujo principal pressuposto seria uma regulação baseada no risco, não apenas no perigo, devendo em todos os casos a identificação de perigo, risco ou dano ser baseada em evidências. Ao aplicar esses princípios, os reguladores deveriam usar abordagens flexíveis, adaptáveis e baseadas em evidências que evitassem, sempre que possível, prejudicar a inovação e o comércio, enquanto cumprissem a responsabilidade do governo federal de proteger a saúde pública e o meio ambiente (DUVALL, 2012).

Ainda hoje, a *FDA* opta por regular produtos baseados em nanotecnologia a partir das normas legais vigentes aplicáveis à categoria específica de produto em que esses sejam enquadrados, não tendo, portanto, publicado qualquer regulamento nano-específico, além de algumas diretrizes produto-específicas, como aquelas aplicáveis a medicamentos, no qual se incluem produtos biológicos, publicizado sob status de “*draft*” (USFDA, 2017); a

medicamentos como lipossomas (*liposome drug products*) (USFDA, 2018); e a produtos cosméticos (USFDA, 2014b) – tendo esses dois últimos já sido publicados como diretrizes finais. Até o momento, não existe qualquer diretriz voltada à área de dispositivos médicos.

Posicionamento esse publicizado nas Diretrizes para a Indústria a respeito de produtos que envolvam nanotecnologia, publicado em 2014 – em que o entendimento da agência reguladora norte-americana sobre a suficiência, robustez e flexibilidade de sua estrutura regulatória para avaliação de segurança de diversos materiais, incluindo-se os nanomateriais, é expressamente manifesto (USFDA, 2014a).

No referido documento são identificados dois aspectos importantes a serem considerados na avaliação de produtos que envolvam a aplicação da nanotecnologia e sejam sujeitos à regulação sanitária da *FDA*: o tamanho da partícula e o fenômeno/propriedade tamanho-dependente. Caso algum deles seja aplicável ao produto objeto de interesse, Agência e/ou indústria deverão se ater à identificação de potenciais impactos à segurança, à eficácia, à saúde pública ou ao status regulatório do produto (USFDA, 2014a) – com vistas a preservar e proteger a saúde da população que porventura seja exposta a produtos de base nanotecnológica.

Portanto, a política regulatória mantida pela *FDA* preserva sua característica científica e de enfoque no produto, expressa por avaliações produto-específicas, ou seja, voltadas aos efeitos biológicos e funcionais provocados por materiais presentes em cada tipo de produto conforme o uso pretendido (USFDA, 2014a) – tratativa essa também aplicada ao processo de análise implementado no âmbito de produtos de base nanotecnológica, avaliados a partir dos regramentos vigentes em uma abordagem do tipo caso a caso.

Evidencia-se assim, que o posicionamento regulatório assumido pela *FDA* ampara-se na adequabilidade dos requisitos existentes à maioria dos produtos nanotecnológicos regulados, estando o racional para essa percepção baseado em duas premissas básicas, conforme asseverado por Janus, Dubé, Goldberg (2014):

a) nas décadas de expediência regulatória da *FDA* no mesmo intervalo de tamanho de materiais em nanoescala (como células, proteínas e moléculas); e

b) no desconhecimento de efeitos adversos à saúde relacionados ao uso de nanomateriais engenheirados em drogas ou dispositivos médicos.

Nesse sentido, os requisitos para autorização pré-mercado a que produtos como medicamentos, produtos biológicos, dispositivos médicos, alimentos e aditivos de coloração estão sujeitos seriam compreensivos e, em geral, também aplicáveis a produtos de base nanotecnológica passíveis de regularização sanitária. Sendo as informações e detalhamentos necessários à revisão dos aspectos de segurança e efetividade desses produtos considerados na

instrução processual das submissões encaminhadas à Agência (JANUS; DUBÉ; GOLDBERG, 2014), conforme políticas específicas aplicáveis a cada categoria de produto (USFDA, 2014a).

Conforme demonstrado, a abordagem adotada pela FDA para regulação de produtos que contenham nanomateriais engenheirados foi amplamente moldada pelo posicionamento manifesto no relatório da Força Tarefa de 2007 – que por um lado, não diferenciou os desafios regulatórios eventualmente impostos pelos nanomateriais, daqueles relacionados a outras tecnologias emergentes; mas que por outro, reconheceu a possibilidade de enfrentamento de situações únicas deflagradas por características e propriedades tamanho-dependentes resultantes à aplicação da Nanotecnologia à diversidade de produtos sujeitos à regulação sanitária, tanto sob as perspectivas científicas como regulatórias.

Especificamente no que tange à regulação de dispositivos médicos, essa está sob escopo da Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (*The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act – FFDCA*), que não apresenta disposições relacionadas à nanotecnologia. Nela se encontra previsão relacionada ao sistema de classificação adotado para categorização de dispositivos médicos segundo grau de risco apresentado, sendo esse dividido em três níveis: I – baixo risco, II – médio risco e III – alto risco. Dispositivos cuja segurança e eficácia já se encontram bem estabelecidas são enquadrados como classe de risco I, sendo por isso sujeitos a controles gerais relacionados à rotulagem, boas práticas de fabricação e relatórios de eventos adversos. Aqueles enquadrados como classe de risco II, são tidos como produtos mais complexos, sendo por isso sujeitos ao regime de Notificação Pré-Comercialização (que envolve controles gerais e especiais), conforme disposto pela seção 510(k) do *FFDCA*. Esse regime baseia-se no princípio da “equivalência substancial” entre dispositivos, evidenciado pelo comparativo de informações obtidas por testes pré-clínicos, e ocasionalmente, dados clínicos provenientes do dispositivo objeto de interesse em relação a dispositivo dito similar, já regularizado e legalmente comercializado. Por fim, dispositivos destinados ao suporte ou manutenção da vida são enquadrados como classe de risco III, e por isso submetidos ao regime de Submissão para Aprovação Pré-mercado (*Premarket Approval Application – PMA*), mais criterioso e necessariamente baseado em evidências clínicas obtidas por estudos clínicos de natureza confirmatória, conduzidos com o próprio produto objeto de interesse, para que este possa ser regularizado (US FDA, 2007).

Apesar da ausência de qualquer previsão normativa a respeito da nanotecnologia no âmbito de dispositivos médicos, essa teve seu potencial formalmente reconhecido pelo Centro de Dispositivos e Saúde Radiológica (*Center for Devices and Radiological Health – CDRH*), área responsável pela regularização dessa categoria de produtos – que em 2011, por meio de

iniciativa de apoio à inovação de dispositivos médicos, manifestou sua preocupação quanto à necessidade de conhecimentos adicionais para adequada avaliação dessa nova tecnologia aplicada a dispositivos médicos (DUVALL, 2012).

No ano anterior, *workshop* público sobre dispositivos médicos e nanotecnologia, intitulado “os obstáculos científicos (por exemplo, biocompatibilidade e toxicidade) para o uso seguro de nanomateriais em dispositivos médicos, incluindo-se aqueles relacionados a não compreensão de processos e normas para sua fabricação e caracterização”¹³, foi realizado pela *FDA*. Dele surgiram algumas questões relacionadas à regulação de dispositivos médicos de base nanotecnológica, sendo a mais controversa delas, a possibilidade desses produtos apresentarem perfis de segurança e eficácia distintos daqueles observados em dispositivos predcados “padrão” (DUVALL, 2012).

Outra possibilidade aventada nessa discussão, apesar de sua limitada repercussão, estaria relacionada à submissão de dispositivos médicos de base nanotecnológica ao criterioso regime de *PMA*, pela simples presença de nanomaterial em sua composição/constituição (DUVALL, 2012) – fato que por si poderia alterar o status ou via regulatória a ser adotada para regularização desse tipo de produto (USFDA, 2007).

Quanto à aplicabilidade do regime 510(k) a dispositivos médicos de base nanotecnológica, a partir de dispositivos predcados já regularizados, mas que não se utilizem da referida tecnologia – trata-se de questão suscitada pelo Relatório da Força Tarefa de 2007, mas ainda não endereçada (DUVALL, 2012).

Conforme demonstrado, apesar da preocupação com os potenciais efeitos e mesmo impactos da nanotecnologia à saúde humana, parece não haver disposição para proposições legislativas ou de alteração do regramento estabelecido pela *FFDCA* – condição que reforça a manutenção da abordagem do tipo caso a caso, até então praticada para regularização de dispositivos médicos que incorporem ou sejam constituídos por nanomateriais, que conforme características e propriedades tamanho-dependentes demonstradas poderá justificar a adoção de um ou outro regime de regularização, conforme grau de risco atribuído ao produto.

Não obstante, compreensão mais aprofundada das propriedades de materiais em nanoescala e das tendências no desenvolvimento e uso desses materiais, faz-se imperativa à adoção de um enfoque mais assertivo quanto aos dados e requisitos de testes aplicáveis (USFDA, 2007), o que tem sido buscado e explorado pela *FDA* ao longo dos últimos anos, por

¹³ No original: *[t]he scientific hurdles (e.g., biocompatibility and toxicity) for the safe use of nanomaterials in medical devices, including the processes and standards for their manufacture and characterization, are not understood* (DUVALL, 2012).

meio de investimento em programas de formação e pesquisa, bem como pela atuação junto aos principais fóruns de discussão a respeito da nanotecnologia aplicada.

1.1.2.3 Brasil

No Brasil, as iniciativas de pesquisa e desenvolvimento nas áreas de Nanociência e Nanotecnologia tiveram início em 2003 com o apoio do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI), a partir da criação do Programa de Desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia, posteriormente, incrementado pelo Plano Nacional de Nanotecnologia, instituído em 2005, e fortalecido pelo lançamento da Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN) em 2013 – cujo objetivo era o de criar, integrar e fortalecer ações governamentais para promover o desenvolvimento científico e tecnológico da Nanotecnologia, com foco na promoção da inovação na indústria brasileira e na prosperidade econômica e social (BRASIL, 2018).

No âmbito da IBN, foram formuladas e implementadas inúmeras ações de promoção e fomento da Nanotecnologia, com especial destaque aos programas “Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)” e “NANoREG (*A common European Approach to the Regulatory Testing of Nanomaterials*); às iniciativas do SibratecNANO (de cooperação internacional), dos comitês consultivos e interministerial, e de articulações externas com outras entidades públicas, associações empresariais, entre outros (BRASIL, 2018).

Desde então a Nanotecnologia se tornou uma área estratégica para o país, devido ao seu potencial competitivo e inovador, para geração de conhecimento, desenvolvimento tecnológico e agregação de valor econômico, político e social (RICCARDI; SANTOS; GUASTALDI, 2015, p. 298).

No Brasil há uma incipiente normatização constituída, basicamente, por portarias publicadas pelo MCTI, com discreto objetivo de criar uma ação institucional direcionada ao tema, instituir um sistema nacional de Nanotecnologia e proporcionar interação com outros programas e sistemas no âmbito desse assunto.

Nessa perspectiva, alguns marcos foram abaixo considerados, com vistas a uma breve elucidação do cenário normativo nacional e produtos resultantes.

- Portaria Interministerial n° 510 de 09 de julho de 2012: instituiu o Comitê Interministerial de Nanotecnologia (CIN), com a finalidade de assessorar os Ministérios

representados nesse Comitê, a saber: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério da Defesa (MD), Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC), Ministério da Educação (MEC), Ministério de Minas e Energia (MME) e Ministério da Saúde (MS) – na integração da gestão e na coordenação, bem como no aprimoramento das políticas, diretrizes e ações voltadas ao desenvolvimento das nanotecnologias no país (BRASIL, 2018).

- Em outubro do mesmo ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) promoveu um debate sobre Nanotecnologia e Vigilância em Saúde, tendo dentre os assuntos elencados na agenda da reunião figurado conceitos, perspectivas e riscos à saúde relacionados à Nanotecnologia.

- Em setembro de 2014, foi oficializada a participação do Brasil no projeto NANoREG, com o objetivo de fornecer às agências reguladoras e aos legisladores brasileiros, as ferramentas necessárias a uma regulamentação em nanotecnologia cientificamente embasada, e consonante com a regulamentação mundial (BRASIL, 2018) .

- Também em 2014, a Nanotecnologia relacionada a produtos e processos sujeitos à vigilância sanitária (tema 112) foi incluída na Agenda Regulatória (AR) da Anvisa (Biênio 2013-2014) como área temática de interesse dentro do macrotema Produtos Sujeitos à Vigilância Sanitária. Conforme disposto por essa Agenda, a inclusão do tema teria como objetivo “promover a regulação sanitária referente às inovações tecnológicas decorrentes da nanotecnologia, tendo em vista a sua importância como área de inovação portadora de futuro, assim como seus potenciais riscos” (BRASIL, 2014a) – tendo esse sido avaliado pelos segmentos da sociedade e pela Anvisa como sendo de alta relevância, urgência e esforço.

- Nesse mesmo ano, foi instituído o Comitê Interno de Nanotecnologia (CIN) no âmbito da Anvisa, por meio da Portaria nº 1358/2014, com a finalidade de coordenar as ações institucionais na área da Nanotecnologia e efetivar o cumprimento do tema na AR.

Conforme disposição estabelecida no art. 3º da mesma Portaria, o CIN seria integrado por representantes de 12 áreas técnicas, tendo sua duração sido estabelecida para o período de um ano, nos termos do art. 9º.

Faz-se oportuno ressaltar que, frente à necessidade de avanço nos mecanismos regulatórios para produtos nanotecnológicos sujeitos à vigilância sanitária, o tema Nanotecnologia foi novamente incluído na Agenda Regulatória da Anvisa - Biênio 2015/2016, agora sob escopo de Outros Temas Transversais, como tema 74, sob a mesma designação

“Nanotecnologia relacionada a produtos e processos sujeitos à vigilância sanitária” (BRASIL, 2015).

Em 2015, o Comitê Interno de Nanotecnologia propôs uma minuta de Resolução que dispunha sobre a obrigatoriedade de informação à Anvisa sobre a composição e as características de produtos sujeitos à vigilância sanitária que apresentassem material intencionalmente produzido em nanoescala.

Conforme veiculado pelo Portal Anvisa, à época, essa norma visava essencialmente coletar informações sobre produtos já existentes no mercado ou em vias de regularização, com o intuito de melhor dimensionar a necessidade regulatória de produtos nanotecnológicos e definir critérios, mecanismos, procedimentos e possíveis instrumentos formais para intervenção e atuação da Agência em relação aos produtos sujeitos à vigilância sanitária que contivessem nanopartículas ou nanomateriais e que utilizassem nanotecnologias. Contudo, a despeito de noticiada sua colocação em consulta pública, para manifestação do setor regulado e sociedade civil, esta não foi efetivada, não tendo por oportuno sido publicada.

Por fim, em julho de 2019, o MCTI publicou a Portaria n° 3.459, por meio da qual tornou a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN), lançada em 2013, um programa estratégico de incentivo à nanotecnologia no país. Conforme disposto pelo art.1° dessa Portaria, a IBN assumiu o *status* de Política Nacional para o Desenvolvimento da Nanotecnologia, com vistas a criar, integrar e fortalecer ações governamentais na área, com foco na promoção da inovação na indústria brasileira e no desenvolvimento econômico e social (BRASIL, 2019).

Além de seus objetivos, encontram-se dispostos na referida Portaria, os eixos estratégicos de fomento da IBN (alinhados com o Plano de Ação de Ciência, Tecnologia e Inovação para Tecnologias Convergentes e Habilitadoras 2018-2022), que preveem o estabelecimento do marco regulatório da área, a implementação do Programa Nacional de Nanosseguurança (art. 4°); as ações e programas estratégicos e estruturantes da IBN (art. 5°); os temas prioritários no âmbito da IBN, dentre os quais destacam-se por sua interrelação com o trabalho ora apresentado: I) nanomateriais e nanocompósitos; III) nanomateriais de base biológica, IV) nanofármacos e nanomedicina, V) nanosseguurança, VI) saúde – dispostos no art. 3° da referida Portaria (BRASIL, 2019).

Também em 2019, foi aprovado o Projeto de Lei (PL) n° 880/2019 que estabelece o Marco Legal da Nanotecnologia e de Materiais Avançados no Brasil, que dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação nanotecnológica; bem como propõe alterações na Lei n° 10.973/2014, que versa sobre incentivo à inovação e à pesquisa científica e na Lei n° 8666/1993, relacionada à Licitações e

Contratos, além de outras providências. Trata-se de importante iniciativa ao incentivo e avanço da Nanotecnologia no país, que ainda se encontra em tramitação no Senado Federal, onde aguarda designação do relator.

Alguns outros PLs relacionados a aspectos mais abrangentes, como: pesquisa e desenvolvimento da nanotecnologia no país (PL n° 5076/2005) e seu incentivo (projeto de lei complementar – PLP n° 23/2019) e; rotulagem de produtos nanotecnológicos e de produtos que fazem uso da nanotecnologia, e sua obrigatoriedade (PL n° 5133/2013) – foram propostos ao longo das últimas duas décadas, tendo todos eles, no entanto, sido arquivados (SENADO NOTÍCIAS, 2020).

Conforme asseverado por Riccardi; Santos; Guastaldi (2015, p. 306), apesar das várias iniciativas relacionadas à temática, verifica-se que o país não avançou na estruturação de uma política nanotecnológica de base nacional para direcionamento de ações e regulamentações específicas na área. Condição que comprometeu, e ainda hoje prejudica, qualquer tentativa de protagonismo e mesmo, acompanhamento dos planos estratégicos globais e de investimentos na regulamentação da nanosseguurança.

Realidade que evidencia a necessidade de mobilização e retomada das discussões, mas principalmente, de concretização e implementação de políticas e diretrizes nacionais voltadas ao desenvolvimento da Nanotecnologia no país, bem como de instrumentos normativos direcionados a sua avaliação e controle – na esteira do que tem sido conduzido e realizado por outros países, que têm baseado suas políticas e, mesmo posicionamentos regulatórios nos modelos estruturados pela União Europeia e Estados Unidos.

Finda essa breve trajetória histórica e legislativa a respeito de como o tema tem sido abordado e conduzido no país, faz-se oportuno retomar sua contextualização no cenário regulatório nacional, marcado pela participação da Anvisa em processos de discussão relacionados à Nanotecnologia nos diversos âmbitos de sua aplicação, e de debate em relação aos seus potenciais riscos e impactos no contexto sanitário. Conforme anteriormente mencionado, algumas foram as iniciativas assumidas pela Agência sobre o tema – que foi incluído na agenda regulatória por dois ciclos bienais consecutivos, para aprofundamento das discussões relacionadas a sua aplicação em produtos sujeitos à vigilância sanitária; e priorizado, frente à instituição de um Comitê Interno destinado a dentre outras ações: coordenar as ações em nanotecnologia no âmbito da Agência, elaborar norma que impusesse aos fabricantes a obrigação de informar a natureza nanotecnológica de produtos e processos sujeitos à vigilância sanitária, supervisionar a elaboração de normas e guias específicos destinados à avaliação de segurança, monitoramento e controle de produtos e processos nanotecnológicos nas áreas de

competência da Agência, elaborar estratégia para capacitação e difusão do conhecimento relacionado ao tema para e entre os servidores da Anvisa, acompanhar atividades e participar de ações de agências congêneres acerca de estratégias regulatórias e de avaliação de risco (BRASIL, 2014b).

Apesar de formalmente instituído, e constituído por representantes das diversas áreas de atuação da Anvisa que tivessem interface com o tema, o referido comitê não logrou êxito na consecução da extensa e ambiciosa relação de atribuições conferidas aos seus membros, ao longo do prazo de 12 meses, estabelecido pela Portaria n° 1.358/2014. Alguns avanços nos processos de capacitação de recursos humanos da Agência na área de Nanotecnologia, bem como no âmbito de discussões, levantamentos e proposições regulatórias (este interrompido no estágio de minuta de Resolução) foram alcançados. Contudo, pode-se dizer que não houve progresso e amadurecimento técnico suficientes para concretização de ações regulatórias base à consolidação de um posicionamento institucional (formal) sobre o tema, perante a sociedade civil organizada, setor regulado e outras partes interessadas. Reflexo disso é a ausência de qualquer manifestação ou publicação veiculadas sob o formato de nota, norma, guia orientativo ou de diretrizes regulatórias produto-específicas relacionadas à política ou estratégia regulatória e de análise de risco aplicáveis a produtos de base nanotecnológica sob escopo de atuação da Anvisa.

No que concerne, especificamente, à área de dispositivos médicos, essa assim como as demais áreas técnicas da Anvisa, ainda não dispõe de regulamentos ou diretrizes regulatórias específicas para avaliação de dispositivos de base nanotecnológica, que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais. Nesse sentido, a regularização desse tipo de dispositivo tem sido realizada por abordagem do tipo caso a caso, com base na legislação sanitária vigente, aplicável à regularização de dispositivos médicos de maneira geral, incluindo-se aqueles categorizados como materiais de uso em saúde (sob escopo do presente trabalho).

Dentre as normas aplicáveis a essa categoria de produtos, destacam-se como referências de aplicação irrestrita as Resoluções de Diretoria Colegiada – RDC n° 185/2001, que versa sobre requisitos gerais relacionados ao processo de regularização sanitária de produtos médicos, bem como estabelece o regramento para seu enquadramento e classificação de risco; e RDC n° 546/2021, que revogou a RDC n° 56/2001, e estabelece os requisitos essenciais de segurança e eficácia a serem observados para qualquer dispositivo médico, incluindo-se aqueles que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais.

A RDC n° 185/2001 trata-se do principal regulamento sanitário utilizado para a análise de dispositivos médicos e encontra-se sob processo de atualização. Cumpre pontuar que na

minuta da nova Resolução, hoje, em fase final de revisão (pós-processos de consolidação da Consulta Pública (CP) 730.2019 e discussão a nível de Mercosul), foram incluídas dentre outras disposições, considerações relacionadas a algumas definições no âmbito da nanotecnologia, bem como o estabelecimento de regra de enquadramento sanitário específica para dispositivos médicos que contenham ou que sejam constituídos por nanomateriais (Regra 19), sendo o sua classificação de risco estabelecida com base no potencial de exposição interna do nanomaterial empregado no produto (se livre, fixado a um recobrimento ou incorporado a uma matriz) – que é também influenciada pelo tipo de produto, via de exposição, nível de invasividade e duração de seu contato no organismo. Em assim sendo, três são as possibilidades de classificação de risco cabíveis a produtos médicos de base nanotecnológica: II (médio risco) – caso o potencial de exposição interna ao nanomaterial seja insignificante; III (alto risco) – caso o potencial de exposição interna ao nanomaterial seja baixo; e IV (máximo risco) – caso o potencial de exposição interna ao nanomaterial seja médio ou elevado (ANVISA, 2019).

Por se tratar de documento harmonizado a nível de Mercosul, suas novas disposições, quando aprovadas e publicadas, também terão efeito sobre a regularização de dispositivos médicos nos países constituintes do bloco, uma vez que estarão contempladas em suas respectivas legislações sanitárias.

É importante ressaltar que, o processo de revisão normativa ora instituído teve como objetivo, além de atualizar seu conteúdo para as inovações tecnológicas e científicas ocorridas ao longo dos últimos anos, dar continuidade ao processo de harmonização regulatória no âmbito do principal fórum de reguladores – IMDRF (*International Medical Device Regulators Forum*) do qual o Brasil faz parte como membro fundador, juntamente, com Austrália, Canadá, Coreia do Sul, Estados Unidos, Japão, Rússia, Cingapura e União Europeia. Isso porque, o regulamento europeu (*EU MDR*), publicado em 2017, e tido como principal referência entre as jurisdições, foi utilizado como base para o processo de revisão e atualização da norma brasileira, cujo conteúdo revela-se bastante alinhado às disposições europeias. Fato esse, especialmente, constatado na inclusão das disposições nano-específicas supra referenciadas.

Quanto às avaliações de segurança e eficácia de dispositivos médicos de base nanotecnológica, dentre os quais se incluem aqueles categorizados como materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, essas são norteadas pela Resolução – RDC n° 546/2021, que estabelece requisitos mínimos à comprovação desses atributos, a serem documentalmente atestados por meio de testes (tais como aqueles de avaliação de segurança biológica previstos pela série de normas ISO 10993), estudos como os de estabilidade (para determinação do prazo de validade do produto), funcionais, de

desempenho, determinação de vida útil a depender do produto, e relatórios de análise (tais como o de gerenciamento de risco, avaliação clínica baseada em literatura, ou mesmo, de pesquisa clínica confirmatória conduzida com o produto) (BRASIL, 2021).

A abrangência dessa avaliação está diretamente relacionada ao risco sanitário atribuído ao produto, sendo essa mais completa e detalhada para produtos enquadrados nas classes de risco III ou IV, regularizados sob o regime de Registro, nos termos da Resolução RDC n° 185/2001 que, categoriza dispositivos médicos passíveis de regularização em quatro classes, a saber: I – Baixo Risco, II – Médio Risco, III – Alto Risco e IV – Máximo Risco.

A Resolução n° 546/2021 trata-se, portanto, de norma geral e de ampla abrangência, por sua estruturação baseada em requisitos e não no cumprimento de lista taxativa de ensaios – condição que viabiliza sua aplicação e compatibilização a diferentes cenários clínicos e tecnológicos. Por isso, esse regulamento mostra-se plenamente extensível e aplicável a tecnologias emergentes, como a nanotecnologia. Sendo sua utilização nesse contexto, moldada pelo caso concreto.

Contudo, cabe ponderar que, o estabelecimento de tratativa regulatória relativamente alinhada com as práticas internacionais pela área técnica responsável pela regularização de dispositivos médicos (incluindo-se os materiais de uso em saúde), não se constitui como condição suficiente e necessária sob uma perspectiva técnica e institucional, haja vista que a instituição de um processo regulatório constitutivo próprio (alicerçado por bases regulatórias nacionais de escopo geral e específico) capaz de harmonizar, entre as diversas áreas de atuação da Anvisa, os preceitos base a serem seguidos e aplicados à análise desse tipo de produto, respeitadas as especificidades pertinentes a cada área e legislação-específica aplicável – fortaleceria o papel e compromisso institucional da Agência perante a sociedade (representada pelos cidadãos, pelos entes regulados e pelo próprio governo), bem como evidenciaria seu amadurecimento regulatório e, por conseguinte, seu grande potencial de contribuição para o avanço das políticas nacionais relacionadas à Nanotecnologia e outras tecnologias emergentes; e do próprio processo de convergência regulatória internacional.

Por todo o exposto até aqui, evidencia-se que, apesar de terem percorridos caminhos distintos e constituído estruturas normativas e entendimentos regulatórios próprios para lidar com a nanotecnologia aplicada no âmbito da saúde, e na área de dispositivos médicos – Brasil, Estados Unidos e União Europeia adotaram estratégia regulatória semelhante, baseada em análise caso a caso, a partir dos instrumentos normativos disponíveis para avaliação global do produto acabado, sendo as especificidades alegadas e/ou identificadas tratadas à luz da ciência

e dos conhecimentos disponíveis, enquanto insumos substanciais a uma análise crítica, baseada em evidência e fundada nos princípios da legalidade e razoabilidade.

1.2 NANOTECNOLOGIA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE E AVALIAÇÃO NANOTOXICOLÓGICA SOB UMA PERSPECTIVA DE RISCO

A área biomédica constitui uma das três principais esferas de aplicação da Nanotecnologia e onde se prevê alcançar 1 trilhão de dólares até 2024 (INSHAKOVA & INSHAKOV, 2017; HE et al., 2019 apud SHINDE et al., 2020, p. 3).

Ela abarca uma ampla diversidade de produtos, no âmbito regulatório, identificados como dispositivos médicos, dentre os quais se distinguem dois grupos: os equipamentos de uso médico-hospitalar e os materiais de uso em saúde. Estes incluem uma miríade de artigos de aplicação médica, odontológica ou laboratorial destinados, em geral, à prevenção, tratamento ou reabilitação; cuja diversidade e variável complexidade possibilitam inúmeras aplicações nanotecnológicas, dentre as quais citam-se, segundo Shinde et al. (2020): a utilização de nanopartículas constituídas por diferentes metais, óxidos metálicos, fosfato de cálcio, cerâmica como *scaffolds* (suportes) para regeneração de tecidos; de nanocarreadores para entrega controlada de drogas; de nano recobrimentos nas superfícies de implantes (especialmente, dentários) para aumento de resistência à corrosão, aumento de ósseointegração; como nano recobrimento de ação antibacteriana para melhoria de estabilidade e prevenção de infecção.

Contudo, apesar de oferecerem vantagens importantes em relação ao uso de materiais convencionais [principalmente, em termos de melhoria de propriedades e, conseqüente obtenção de maiores benefícios clínicos], o aumento no uso de nanomateriais em aplicações biomédicas tem levantado preocupações importantes sobre sua segurança, biocompatibilidade e toxicidade, frente ao seu maior potencial de exposição e interação com o sistema biológico (ADABI et al., 2016) – o que tem mobilizado interesses, recursos e avanços na investigação de potenciais efeitos tóxicos deflagrados por nanomateriais no organismo humano.

Enquanto subárea da toxicologia, a Nanotoxicologia dedica-se ao estudo dos efeitos resultantes à interação dos nanomateriais com os sistemas biológicos (OBERDÖRSTER, 2009; SAVOLAINEN et al., 2013), o que implica extensa avaliação pré-clínica, iniciada com o processo de caracterização de propriedades físico-químicas em diferentes cenários, complementado pelo delineamento de uma avaliação de segurança biológica abrangente,

geralmente, baseada em testes, definidos a partir das características do nanomaterial empregado, de sua apresentação no dispositivo objeto de análise, do seu potencial de exposição no organismo, bem como da identificação de perigos potencialmente relacionados à aplicação e finalidade do produto.

Conforme disposição constante em documento elaborado pelo *SCENIHR*, publicado no ano de 2007, a avaliação de segurança e gerenciamento de risco de nanomateriais difere (ou deveria diferir) daqueles realizados em substâncias convencionais e impõe desafios substanciais (*SCENIHR*, 2015).

Isso porque nanopartículas engenheiradas (amplamente investigadas no âmbito das aplicações biomédicas) podem envolver diferentes transformações físicas, químicas e biológicas – que podem ocorrer a depender de fatores ambientais (como valor de pH, concentrações de sal, crescimento natural de microrganismos e questões naturais inerentes). Nesse sentido, o conhecimento de propriedades físicas e químicas tais como distribuição de tamanho das partículas, morfologia, composição das partículas, área de superfície das partículas, concentração do número de partículas, superfície química, mecanismos de liberação (deposição, adsorção, aglomeração, agregação e reações de oxidação/redução, por exemplo) e reatividade das partículas em solução são, particularmente, importantes ao propósito de avaliação de risco (*RICCARDI; SANTOS; GUASTALDI*, 2015, p. 53).

Em conjunto, os dados obtidos no processo de caracterização físico-química de nanomateriais e aqueles oriundos da avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica, constituem as informações nanotoxicológicas que subsidiarão a avaliação de risco biológico relacionada à presença de materiais em nanoescala nesse grupo de produtos, que conforme asseverado por Jagiello et al. (2017), deve levar em consideração a possibilidade de liberação das nanopartículas desses dispositivos, e seus potenciais efeitos tóxicos associados às características físico-químicas identificadas, assim como a outros aspectos relacionados ao próprio produto, seu nível de contato e duração no organismo.

Contudo, conforme sinalizado pela literatura disponível, muitas são as limitações das metodologias hoje disponíveis, e empregadas no processo de análise nanotoxicológica, o que tem comprometido não apenas seu avanço enquanto ciência, mas principalmente, a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos por meio desse tipo de abordagem, motivo pelo qual a avaliação e gerenciamento de risco tornam-se imperativos, apesar de ainda insuficientes. Nesse contexto, cumpre enfatizar a importância da utilização de métodos normatizados e validados para o propósito de análise requerido, bem como de seu domínio e

competência para execução por parte dos laboratórios contratados, com vistas à obtenção de resultados fidedignos.

Por isso, o desenvolvimento de estratégias integradas, que se utilizem da associação entre metodologias tradicionais e especificamente desenvolvidas para a análise de nanomateriais (o que persiste como uma grande dificuldade); bem como de metodologias computacionais preditivas, são tidas como importantes janelas de oportunidade rumo à obtenção de dados mais qualificados à tomada de decisão nos âmbitos científico e regulatório – apesar de ainda incipientes.

Frente a toda essa conjuntura de evolução e desenvolvimento, entremeada por preocupações e incertezas, por um marcante dissenso conceitual, diretamente refletido nas estruturas regulatórias existentes (ainda em processo de construção e consolidação), e naquelas ainda por existir; bem como pelos importantes desafios e limitações enfrentadas no campo da nanotoxicologia, inclusive no que tange ao âmbito de aplicação biomédico – é que o presente projeto de pesquisa foi proposto.

Ele tem como intuito construir, a partir da literatura disponível, diretrizes regulatórias base à avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, sob uma perspectiva de risco, com vistas a subsidiar e sistematizar o processo de análise regulatória aplicada a esse tipo de produto em território nacional, especificamente, no que se refere aos aspectos nanotoxicológicos, em consonância com o conhecimento científico disponível, com as abordagens regulatórias adotadas pelas jurisdições europeia e norte-americana, e com as normas técnicas de referência disponibilizadas no âmbito da Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization - ISO*), tais como: ISO/TR 13014 – dedicada ao processo de caracterização físico-química de nanomateriais engenheirados para avaliação toxicológica, ISO/TR 10993-22 – dedicada à avaliação biológica de nanomateriais incorporados ou liberados de dispositivos médicos (sem desconsiderar as disposições gerais e nano-específicas constantes nas demais partes da série ISO 10993), ISO 14971, relacionada à aplicação do Gerenciamento de Risco a dispositivos médicos, ISO/TR 24971 enquanto guia para aplicação da norma ISO 14971 e ISO/TR 13121, que no âmbito da nanotecnologia, versa sobre avaliação de risco de nanomateriais, de modo geral.

Consubstanciando-se assim como potencial instrumento de referência ao progresso científico e regulatório do tema em âmbito nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construir arcabouço teórico consistente sob o ponto de vista científico e regulatório que viabilize uma compreensão ampliada sobre a Nanotecnologia e a Nanotoxicologia aplicadas a Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, por meio de uma abordagem exploratória e descritiva do conhecimento existente.

2.1.1 Objetivos Específicos

a) Identificar os principais desafios regulatórios relacionados à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos categorizados como materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais; e

b) Estruturar uma proposição regulatória orientativa base à avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde constituídos por materiais e/ou estruturas em nanoescala, sob uma perspectiva de risco, a partir de extensa revisão bibliográfica, consulta a normas técnicas aplicáveis e, seu alinhamento à legislação sanitária nacional vigente.

3 METODOLOGIA

Trata-se de pesquisa exploratória, ancorada em abordagem essencialmente teórica, alicerçada em extensa e sistemática revisão bibliográfica, tendo essa sido executada a partir de duas estratégias de busca: a primeira livre, e portanto, não estruturada, com o intuito de obter um panorama geral sobre o escopo delineado para a pesquisa, e uma maior compreensão quanto à aplicação da temática ao contexto regulatório de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais; tendo a segunda, estruturada, sido concebida e sistematizada sob as bases de uma revisão de escopo.

Assim, optou-se em um primeiro momento, por uma revisão bibliográfica geral, realizada a partir do serviço *Google Busca* e baseada em uma ampla variedade de termos combinados (identificados a partir das palavras-chaves mais comumente utilizadas nas publicações recuperadas, bem como advindas do processo de leitura dos textos identificados), dentre os quais: “*nanotechnology, nano-medical devices, nano-enabled medical devices, nano-enhanced products, nanodevices, nano-based products, nanomedicine, nanomaterials, engineering nanomaterials, nanotextured materials, nanostructured materials, nanocoatings, regulation, EU regulation, nanoregulation, regulatory decision making, biocompatibility, nanotoxicology, nanosafety, safety assessment, nanotoxicology testing, biological systems, nano-bio-interface, physicochemical properties, risk assessment, risk management, risk assessment framework, safety by design, safe-by-design*”.

Para busca, identificação e acesso a normas técnicas relacionadas ao tema objeto de estudo, utilizou-se a plataforma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – ABNT Coleção. Considerando o amplo acesso institucional oferecido às normas ISO nesta plataforma, essas foram privilegiadas nas consultas realizadas durante a consecução deste trabalho. Sua identificação na ABNT Coleção se deu a partir de consulta direcionada ao Comitê Técnico (*Technical Committee – TC*) responsável, dentro da própria ISO, por discussões de padronização e normatização no âmbito das Nanotecnologias – ISO/TC 229. Tendo pela relação de normas elencadas se distinguido aquelas objeto de interesse.

Como resultado final desse processo de busca livre inicialmente realizado, foram alcançadas publicações diversas, constituídas não apenas por artigos científicos indexados, mas por livros e capítulos de livros relacionados ao macrotema “nanotecnologia” e a temas correlacionados ao projeto de pesquisa proposto, tais como “regulação, dispositivo médico, nanotoxicologia, nanosseguurança e gerenciamento de risco”, além de guias e documentos

emitidos por organizações engajadas na expansão do conhecimento em nanotecnologia aplicada a dispositivos médicos, e por conseguinte, a materiais de uso em saúde. Ademais, cumpre pontuar que também foram realizadas buscas manuais (*hand searching*) resultantes ao levantamento cruzado das referências bibliográficas reportadas nos documentos consultados.

Frente ao escopo do material recuperado e objetivos estabelecidos para condução desta revisão, foram considerados tanto publicações convencionais (identificadas como “literatura branca” descrita como comercial, formal, revisada por pares tais como livros e artigos publicados em revistas científicas) como não convencionais (referenciadas como “literatura cinzenta”, dentre as quais citam-se normas técnicas, relatórios e diretrizes elaborados e publicizados por autoridades e/ou outras entidades e organizações governamentais e não-governamentais interessadas, tanto em âmbito nacional como internacional) – assim classificados, conforme revisão conceitual de Botelho & Oliveira (2017).

No que concerne à busca estruturada, essa foi delineada e realizada segundo racional para condução de uma revisão de escopo, descrita por Colquhoun et al. (2014) como “uma forma de síntese do conhecimento, que incorpora uma gama diversificada de estudos para resumir e sintetizar evidências de modo abrangente, com o objetivo de informar a prática, programas e políticas, e fornecer orientação para futuras prioridades de pesquisa”. Sob a ótica de Daudt, Van Mossel, Scott (2013, p. 8), as revisões de escopo viabilizariam o mapeamento da literatura sobre determinado tópico ou área de pesquisa, oportunizando assim a identificação de conceitos-chave, lacunas de pesquisa e, tipos/fontes de evidência disponível para informar a prática, a formulação de políticas e a pesquisa.

Essa é uma proposta de revisão que tem se popularizado nos últimos anos, por fornecer uma visão geral ampla sobre o tópico/campo de estudo, o que a torna particularmente útil em áreas emergentes, cuja pergunta de pesquisa seja ampla. Apesar de sua natureza exploratória, a revisão de escopo pode ser conduzida sob orientações metodológicas sistematizadas, quanto aos processos de busca, seleção e síntese do conhecimento existente, independentemente de sua qualidade, e ter seus achados reportados de modo narrativo/descritivo, tabulado ou diagramado a partir de critérios de boas práticas para redação de relatório (COLQUHOUN et al., 2014; LOCKWOOD; TRICCO, 2019; THE JOANNA BRIGGS INSTITUTE, 2015; TRICCO et al., 2016), o que lhe confere reprodutibilidade, completude, transparência e redução da ocorrência de *reporting bias* (“viés de relato”, em tradução livre).

Para tanto, é necessário que um protocolo, enquanto plano, seja previamente proposto e registrado para que a revisão de escopo possa então ser iniciada. Nele devem ser especificados os critérios de inclusão e exclusão, os quais devem estar claramente relacionados ao objetivo

da pergunta de revisão; e a metodologia a ser implementada em termos de estratégia de busca, seleção, extração e apresentação de resultados (THE JOANNA BRIGGS INSTITUTE, 2015).

Nesses termos, optou-se pela elaboração de um protocolo de revisão de escopo prévio a sua condução, o qual se encontra disponível no Apêndice A, tendo esse sido registrado na plataforma *Open Science Framework (OSF)*, em 07/12/2020 sob o *Digital Object Identifier (DOI)* 10.17605/OSF.IO/C9BZF, disponibilizado sob o domínio <https://osf.io/c9bzf>. Para estruturação metodológica da revisão adotaram-se como referências o Manual de Revisores do Instituto Joanna Briggs – *Methodology for JBI Scoping Reviews* (THE JOANNA BRIGGS INSTITUTE, 2015) e o *checklist “The Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) extension for Scoping Review (PRISMA-ScR)”*, tendo este também sido utilizado como diretriz para reporte dos resultados obtidos e de seus principais achados.

Cumprir pontuar que anteriormente à etapa de elaboração do protocolo de revisão de escopo, foram conduzidas pesquisas preliminares para identificação de eventuais revisões de escopo relacionadas ao tópico objeto de estudo. Essas foram realizadas em 06/12/2020 a partir das bases de dados *PubMed* e *Cochrane Library*, com base nas seguintes estratégias de busca: (((("nanotechnology 138669"[All Fields]))) AND ("medical devices"[All Fields])) AND ("regulation"[All Fields])) AND ("scoping review"[All Fields]); e (((nanotechnology) AND (medical devices)) AND (regulation)) AND (safety management)) AND (scoping review), respectivamente. Não foram encontrados quaisquer resultados.

Para formulação do título, pergunta e estabelecimento dos objetivos do protocolo da revisão de escopo realizada, utilizou-se o mnemônico “PCC” (população, conceito e contexto) sugerido pelo Instituto Joanna Briggs, como referência – por evidenciar aos leitores as informações centrais abarcadas pela revisão de escopo proposta.

Aplicado à pesquisa objeto desta dissertação, o referido mnemônico foi assim descrito:

- População (P): dispositivos médicos de base nanotecnológica;
- Conceito (C): avaliação de segurança biológica em um contexto de gerenciamento de risco;
- Contexto (C): regulação sanitária.

Nesses termos, título, objetivo e questão de pesquisa foram elaborados a partir dessas informações, de modo que uma relação de congruência entre eles pudesse ser estabelecida, conforme a seguir transcrito:

Título:

Os desafios regulatórios da avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica, sob uma perspectiva de gerenciamento de risco: uma revisão de escopo.

Objetivo:

Mapear e avaliar a literatura disponível sobre avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica, sob uma perspectiva de gerenciamento de risco, com vistas a subsidiar a proposição de diretrizes regulatórias base à avaliação desta categoria de produtos em território nacional, levando em consideração os desafios impostos pelas especificidades desta tecnologia habilitadora na área da saúde e as lacunas de conhecimento existentes.

Questão Principal:

- Como a avaliação biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica se diferencia da avaliação regular realizada para dispositivos médicos, de modo geral?

Questões secundárias:

- Quais são os desafios envolvidos na avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica?

- Como eles têm sido tratados?

- Como a avaliação de dispositivos médicos de base nanotecnológica tem avançado para superar os desafios e dificuldades inerentes a este contexto?

Quanto aos critérios de inclusão e exclusão considerados na revisão de escopo proposta, esses não foram rigorosos pela própria finalidade e natureza da abordagem adotada. Assim, estabeleceram-se como critérios de:

Inclusão: publicações relacionadas a dispositivos médicos de base nanotecnológica enquadrados na categoria “materiais de uso em saúde”, à regulação, à avaliação de segurança biológica e/ou gerenciamento de riscos biológicos aplicados a essa categoria de dispositivos. Ademais, publicações gerais relacionadas a esses tópicos (mesmo que não especificamente relacionadas a dispositivos médicos) também foram consideradas frente ao seu potencial para subsidiar um conhecimento ainda em construção nesse campo.

Não houve restrição quanto às fontes de informação a serem incluídas no processo de revisão implementado. Tendo-se, portanto, incorporado todas as publicações identificadas de forma irrestrita.

Exclusão: publicações relacionadas a equipamentos médico-hospitalares e produtos para diagnóstico *in vitro* foram descartadas, visto que essas categorias de produtos para saúde não se encontram sob escopo desta dissertação. Aquelas relacionadas a nanomedicamentos e a

produtos classificados como “*borderlines*” (limítrofes), cujo enquadramento como medicamento ou dispositivo médico não se encontra bem consolidado, também foram excluídas. Publicações em idiomas diversos ao português, inglês e espanhol foram desconsideradas.

No que tange à estratégia de buscas, para que fosse compreensiva na identificação da literatura disponível sobre o tema, essa foi implementada a partir de duas bases de dados de escopo geral: *Medline/PubMed* e *Embase*. A primeira por concentrar publicações anglo-americanas e por seu escopo nas áreas de biomedicina e saúde, com abrangência em tópicos relacionados às ciências da vida, às ciências químicas e à bioengenharia, necessárias às atividades de pesquisa, saúde pública, desenvolvimento de políticas de saúde. E a última, por se apresentar como um banco de dados abrangente e atualizado da literatura biomédica, recomendado por órgãos e autoridades regulatórias para manutenção do conhecimento sobre perfis de segurança, evidências clínicas e econômicas, além de se constituir como a principal referência de publicações europeias.

Sobre esse aspecto, cumpre pontuar que bases de dados nacional e latino-americana, como SciELO Brasil, BIREME e LILACS, não foram incluídas devido à dificuldade de identificação de descritores adequados e aplicáveis ao escopo do trabalho na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) – condição que inviabilizou a efetivação de buscas bem-sucedidas e, por conseguinte, a recuperação de publicações de interesse relacionadas à temática proposta nas bases referenciadas.

Em assim sendo, a partir dos termos identificados na busca livre, procedeu-se à identificação dos *MESH terms* no campo *Mesh Database*, para posterior estruturação da estratégia de buscas a ser implementada na base de dados *Medline/PubMed*. Contudo essa não se mostrou assertiva, conforme demonstrado no Quadro 1 – seja pela não localização de resultados, seja pela inespecificidade de possíveis termos aplicáveis – condição que pode ter comprometido o resultado das combinações propostas entre termos *MESH* e *Entry terms* por meio do uso dos operadores booleanos “*AND*” (para integração dos conjuntos de termos chave) e “*OR*” (entre sinônimos), respectivamente, e por conseguinte, das tentativas de busca realizadas, que recuperaram artigos inespecíficos e, em sua maioria, pouco relacionados ao escopo do trabalho.

Quadro 1 - Resultado *Mesh Terms*

Termo pesquisado	Mesh Term	Entry terms
<i>Nanotechnology</i>	“ <i>Nanotechnology</i> ” [Mesh]	“ <i>nanotechnology</i> ” [Mesh]
<i>Nanomedicine</i>	“ <i>Nanomedicine</i> ” [Mesh]	“ <i>nanomedicine</i> ” [Mesh]
<i>Medical Device</i>	“ <i>Equipment and Supplies</i> ” [Mesh]	<i>Supplies and Equipment Apparatus and Instruments Instruments and Apparatus Supplies Inventories Inventory Medical Devices Medical Device Device, Medical Devices, Medical Devices Device Equipment</i>
<i>Implant</i>	* Termos muito específicos ou inaplicáveis ao propósito do trabalho	-
<i>Biocompatibility</i>	“ <i>Materials Testing</i> ” [Mesh]	<i>Testing, Materials Testing, Biocompatible Materials Biocompatible Materials Testing Materials Testing, Biocompatible Biocompatibility Testing Testing, Biocompatibility Testings, Biocompatibility Hemocompatibility Testing Hemocompatibility Testings Testing, Hemocompatibility Testing, Hemocompatible Materials Hemocompatible Materials Testing Materials Testing, Hemocompatible</i>
<i>Biological Evaluation</i>	<i>Not found</i>	-
<i>Nanosafety</i>	<i>Not found</i>	-
<i>Nanotoxicology</i>	<i>Not found</i>	-
<i>Risk management</i>	“ <i>Risk management</i> ” [Mesh]	<i>Management, Risk Management, Risks Risks Management Reporting, Hospital Incident Reportings, Hospital Incident Reportings, Hospital Risk Hospital Risk Reporting Hospital Risk Reportings Reporting, Hospital Risk Risk Reporting, Hospital Risk Reportings, Hospital Incident Reportings, Hospital Incident Reporting, Hospital Hospital Incident Reportings Voluntary Patient Safety Event Reporting Hospital Incident Reporting</i>

		<i>Incident Reporting Incident Reportings Reporting, Incident Reportings, Incident</i>
Regulation	<i>“Medical device Legislation” [Mesh]</i>	<i>Device Legislation, Medical Device Legislations, Medical Legislation, Medical Device Legislations, Medical Device Medical Device Legislations Medical Equipment Legislation Equipment Legislation, Medical Equipment Legislations, Medical Legislation, Medical Equipment Legislations, Medical Equipment Medical Equipment Legislations Medical Device Regulation Device Regulation, Medical Device Regulations, Medical Medical Device Regulations Regulation, Medical Device Regulations, Medical Device</i>
Nanoregulation	<i>Not found</i>	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Tal fato pode ser compreendido à luz do processo de construção e evolução do conhecimento em campos emergentes como o da Nanotecnologia, que por seu alto potencial de inovação e aplicação, bem como multidisciplinaridade, acaba sendo impactada pela rápida geração de novos termos, descritores e definições [não padronizados e harmonizados] (QUIROS-PESUDO et al., 2018) – condição que compromete não só o estabelecimento de terminologias consistentes, mas sua compreensão e emprego adequados entre as diferentes disciplinas científicas e atores envolvidos (GOTTARDO et al., 2017), e por conseguinte, a busca, recuperação, compartilhamento e integração de dados e informações assertivos em diferentes níveis (LÓPEZ-ALONSO; GARCÍA-CAMBERO, 2014).

Por esse motivo optou-se pela condução de busca avançada direta, via *PubMed Advanced Search Builder*. Para tanto, a opção “*all fields*” foi mantida para todas as adições realizadas, tendo-se a cada inserção de um novo termo, sido visualizado seu respectivo índice, disponível no “*Show Index*” – com vistas à identificação e escolha de terminologias mais sensíveis e próximas ao objeto de interesse da pesquisa. Nesse sentido, foram utilizados os seguintes termos para construção de estratégia de busca primária: “*nanotechnology, medical devices, combination products, implants, safety evaluation, nanosafety, nanotoxicology, nanotoxicology assays, nanotoxicology data, nanotoxicology models, nanotoxicology, nanomedicine*” - tendo esses sido combinados pelo uso dos operadores booleanos “*AND*” e “*OR*”, conforme demonstrado a seguir.

Com o intuito de manter um alcance ampliado de publicações, optou-se pela base de dados *Embase*. Nela a estratégia de buscas foi implementada a partir da identificação de *Emtree terms* pela ferramenta “*Query Builder*” para criação de uma estratégia de busca composta por vários termos, sob o formato de busca ampliada, determinado pela escolha da opção “*Explode*” (*/exp*). Definidos os “*mtree terms*” sob escopo do tema de pesquisa, esses foram apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Resultado *Emtree Terms*

Termo pesquisado	<i>Emtree Term</i>	<i>Emtree Term (/exp)</i>
<i>nanotechnology</i>	<i>nanotechnology</i>	' <i>nanotechnology</i> '/ <i>exp</i> / <i>mj</i> OR ' <i>nanotechnology</i> '/ <i>mj</i>
<i>nanomedicine</i>	<i>nanomedicine</i>	' <i>nanomedicine</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>nanomedicine</i> '
<i>nanocoating</i>	<i>nanocoating</i>	' <i>nanocoating</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>nanocoating</i> '
<i>medical device</i>	<i>medical device</i>	' <i>medical device</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>medical device</i> '
<i>medical device</i>	<i>medical device regularion</i>	' <i>medical device regulation</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>medical device regulation</i> '
<i>safety</i>	<i>safety</i>	' <i>safety</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>safety</i> '
<i>nanotoxicology</i>	<i>nanotoxicology</i>	' <i>nanotoxicology</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>nanotoxicology</i> '
<i>nanotoxicity</i>	<i>nanotoxicity</i>	' <i>nanotoxicity</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>nanotoxicity</i> '
<i>risk</i>	<i>risk assessment</i>	' <i>risk assessment</i> '/ <i>exp</i> OR ' <i>risk assessment</i> '

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Combinados por meio do uso dos operadores booleanos “*OR*” e “*AND*”, estruturou-se estratégia de busca base, que foi importada para a opção de busca avançada para maior refinamento. Nessa etapa, foram realizadas algumas delimitações com vistas à otimização de resultados, quais sejam:

- Mapeamento: pela abrangência do tema, finalidade do projeto de pesquisa e tipo de revisão adotada, foram assinaladas todas as opções de busca ampliada para obtenção de resultados mais inclusivos (*/exp*) pela integração de termos relacionados mais específicos na hierarquia vocabular (*/mj = major subject heading*) – *map to preferred term in Emtree, search also as free text in all fields, explode using narrower Emtree terms e search as broadly as possible*);

- Data: não foi estabelecido limite ou intervalo temporal para a busca de publicações;
- Fontes: considerando-se que a estratégia de buscas desse trabalho também compreendeu a base de dados *Medline/Pubmed*, apenas a fonte *Embase* foi assinalada.

- Tipos de publicação: dentre as opções listadas, foram incluídos artigos e revisões;
- Idiomas: foram limitados a publicações em português, inglês e espanhol.
- Demais filtros (campos, limites rápidos, medicina baseada em evidências, gênero, idade e animal) não foram considerados, por sua inaplicabilidade ao objeto de pesquisa.

Findo esse processo, procedeu-se à efetivação da estratégia de busca construída, cujo formato e resultado foram apresentados no

Quadro 3, juntamente, com a estratégia de busca por ferramenta avançada, construída na base de dados *Medline/PubMed*, anteriormente referenciada.

Quadro 3 - Consolidação das Estratégias de Busca por Base de Dados

Base de dados (data de consulta)	Termos de busca combinados	Resultado
Medline/PubMed (12/12/2020)	<i>("nanotechnology"[All Fields]) AND ("medical devices"[All Fields]) OR ("combination products"[All Fields]) OR ("implants"[All Fields]) AND ("safety evaluation"[All Fields]) OR ("nanosafety"[All Fields]) OR ("nanotoxicology"[All Fields] OR "nanotoxicology assays"[All Fields] OR "nanotoxicology data"[All Fields] OR "nanotoxicology models"[All Fields] OR "nanotoxicology nanomedicine"[All Fields])</i>	4316 publicações
Embase (25/01/2021)	<i>(('nanotechnology'/exp OR 'nanotechnology' OR 'nanomedicine'/exp OR 'nanomedicine' OR 'nanocoating'/exp OR 'nanocoating') AND ('medical device'/exp OR 'medical device') AND ('medical device regulation'/exp OR 'medical device regulation') AND ('safety'/exp OR 'safety') OR 'nanotoxicology'/exp OR 'nanotoxicology' OR 'nanotoxicity'/exp OR 'nanotoxicity') AND ('risk assessment'/exp OR 'risk assessment') AND ([article]/lim OR [review]/lim) AND ([english]/lim OR [portuguese]/lim OR [spanish]/lim) AND [embase]/lim</i>	547 publicações

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

O critério de elegibilidade aplicado à seleção dos estudos incluídos nesta revisão baseou-se essencialmente na identificação dos domínios-chave (evidenciados pelo mnemônico PCC, anteriormente descrito) contidos em cada uma das estratégias de busca estabelecidas, o que se deu, inicialmente, a partir da leitura dos títulos e resumos das publicações obtidas. Concluída essa etapa, procedeu-se à leitura dos artigos selecionados na sua integralidade para delineamento e posterior análise de sua abordagem. Cumpre pontuar que, as referências das publicações selecionadas também foram consultadas para identificação de materiais adicionais.

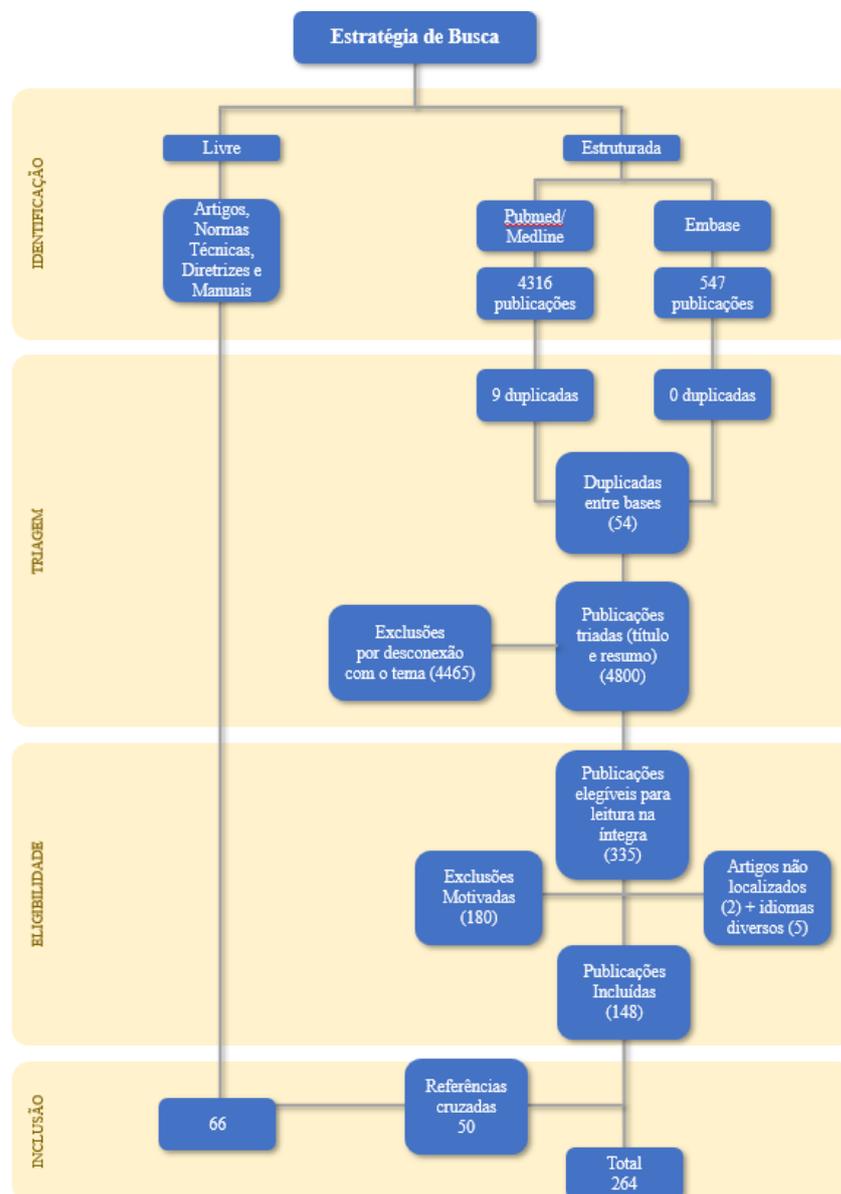
Quanto às publicações em duplicata e aquelas identificadas como desconexas aos domínios-chave estabelecidos nas estratégias de busca (quando de sua triagem ou leitura na íntegra), ambas foram excluídas.

Por todo o exposto, evidencia-se que o delineamento metodológico apresentado teve como intuito, mapear o conhecimento disponível na temática proposta a partir de um conjunto diversificado de publicações, não apenas capaz de viabilizar a obtenção de um acervo informacional assertivo e abrangente da literatura recuperada, para subsidiar (em conjunto com os achados resultantes à busca não-estruturada realizada *a priori*) a proposição de diretrizes regulatórias base à avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde de base nanotecnológica – com vistas a uma abordagem regulatória crítica, transparente e alinhada ao conhecimento existente e às práticas regulatórias globais; mas também, capaz de minimizar eventual *reporting bias* no processo de inclusão bibliográfica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil metodológico traçado para realização da revisão bibliográfica requerida viabilizou a obtenção de extensa e variada bibliografia, conforme premissa inicialmente considerada, tendo esse sido esquematicamente representado pelo Fluxograma 1, no qual se encontram descritas as principais etapas e resultados obtidos nos processos de busca conduzidas de modo livre e estruturado.

Fluxograma 1- Estratégias de Busca Bibliográfica



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Conforme demonstrado, foram recuperados por busca livre 66 publicações dentre artigos de revisão, guias e documentos institucionais, normas técnicas de referência, regulamentos nacionais e internacionais. Pelo caráter exploratório desse tipo de busca, seus resultados subsidiaram o texto base do arcabouço teórico proposto, desenvolvido a partir de duas vertentes: Panorama sobre a Nanotecnologia aplicada a Materiais de Uso em Saúde e seu perfil no cenário regulatório nacional e Avaliação de Segurança Biológica aplicada a Materiais de Uso em Saúde de base nanotecnológica, sob uma Perspectiva de Risco – apresentadas como capítulos mestre desta seção.

Quanto à estratégia de busca estruturada realizada nas bases de dados *Medline/PubMed* e *Embase* foram identificadas 4.316 e 547 publicações, respectivamente, tendo 63 sido excluídas por duplicata e 4.465 por desconexão com o tema, constatada após triagem inicial realizada a partir da análise de títulos e resumos. Dentre os motivos identificados destacaram-se: publicações do tipo reprimenda, errata, correção; temática não relacionada à nanotecnologia ou com enfoque direcionado à nanotecnologia aplicada às áreas de medicamentos, cosméticos, alimentos, agricultura, agrotóxicos, ecotoxicologia, remediação ambiental; avaliações nanotoxicológicas relacionadas a órgãos, tecidos, sistemas e/ou nanomateriais específicos.

Ao todo, 335 documentos tornaram-se elegíveis para leitura de seu conteúdo na íntegra. Destes, duas publicações não foram localizadas a partir das informações obtidas (título, *DOI* e autores); e outras cinco foram redigidas em idioma diverso (duas em chinês e três em japonês) – motivo pelo qual não tiveram seu conteúdo acessado e avaliado. Portanto, restaram 328 publicações para avaliação, dentre as quais 180 foram excluídas – pelos motivos explicitados no Apêndice B. Do levantamento cruzado das referências bibliográficas constantes nas publicações selecionadas (tanto na busca livre quanto estruturada), foram identificados e incluídos outros 50 documentos.

No que tange aos critérios estabelecidos para seleção e inclusão dos artigos na revisão de escopo proposta, cumpre pontuar que, esses foram observados e aplicados sob uma perspectiva ampla, por meio da qual foram abarcadas tanto publicações diretamente relacionada à nanotoxicologia aplicada a dispositivos médicos (com enfoque naqueles categorizados como materiais de uso em saúde), quanto publicações de abordagem geral relacionadas aos macrotemas: nanotoxicologia, regulação, avaliação de segurança biológica, e avaliação de risco. Conforme esperado e, previamente, observado no processo de busca livre, publicações especificamente relacionadas à segurança biológica de materiais de uso em saúde de base nanotecnológica foram escassas, condição inclusive refletida pelo conteúdo de guias,

documentos e normas recuperados nesse processo, baseados em literatura de escopo geral adaptadas à realidade de dispositivos médicos.

De modo geral, 148 publicações foram recuperadas da busca estruturada, tendo essas sido essencialmente constituídas por artigos de revisão, textos editoriais, perspectivas, comentários, prefácios, relatos e opiniões – tornados públicos entre 2007 e 2020, em revistas científicas de conceito variável (fator de impacto entre 0.62 e 31.538). No processo de leitura e análise desse material foram identificados seis macrotemas relacionados à temática, aos objetivos e às perguntas objeto de interesse propostas pela revisão de escopo, conforme apresentado pelo Quadro 4.

Quadro 4 - Categorização das publicações incluídas pela Revisão de Escopo por macrotemas

Macrotemas		Quantitativos
1.	Nanotoxicologia aplicada a Dispositivos Médicos	11
2.	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração	21
3.	Avaliação e Testes de Segurança Biológica	35
4.	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão	16
5.	Regulação	6
6.	Desafios Nanotoxicológicos e Nanotoxicologia Preditiva	59
Total		148

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

No que se refere às 50 referências cruzadas incluídas, essas se caracterizaram por abarcarem publicações diversas (desde documentos redigidos por entidades a serviço da Comissão Europeia, como o JRC, a diretrizes governamentais/regulatórias relacionadas a outras categorias de produtos, algumas legislações nacionais, normas técnicas e publicações diversas (do tipo revisão, em grande parte) relacionadas às temáticas abordadas pelo trabalho), publicizadas entre os anos de 2002 e 2020.

Nesses termos, tomando-se as orientações constantes no Manual de Metodologia para Revisão de Escopo – The Joanna Briggs (2015) como referência, procedeu-se à elaboração de Quadros de Extração de Resultados, correspondentes a cada um dos macrotemas supramencionados, para agrupamento dos artigos incluídos conforme temática predominante. Por sua extensão, os referidos quadros não foram disponibilizados. Contudo, informações sumarizadas em relação aos artigos analisados serão apresentadas no Apêndice C, para conhecimento e transparência.

Isso porque, a consolidação dos achados mais relevantes desses resultados será reproduzida e textualmente diagramada no capítulo “Avaliação de Segurança Biológica aplicada a Materiais de Uso em Saúde de base nanotecnológica, sob uma Perspectiva de Risco”,

onde será estruturada e apresentada sob a forma de subcapítulos, intitulados com base nos macrotemas identificados – por constituir parte substancial dos resultados alcançados por este trabalho.

Quanto às reflexões resultantes às perguntas norteadoras da revisão de escopo, essas foram incluídas ao final da seção, como fechamento dos resultados obtidos nesse extenso processo de revisão e análise.

4.1 PANORAMA SOBRE A NANOTECNOLOGIA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE E SEU PERFIL NO CENÁRIO REGULATÓRIO NACIONAL

A Nanotecnologia é um dos campos emergentes mais importantes nas ciências médicas (KALANGUTKAR, 2015), com potencial para impactar significativamente a tecnologia médica e revolucionar o sistema de saúde (SOLAIMAN et al., 2017).

Isso porque, nanomateriais engenheirados estariam na vanguarda de campos emergentes como a Nanobiotecnologia e a Nanomedicina, já que por sua síntese meticulosa e propriedades físico-químicas únicas, esses viabilizariam uma grande variedade de aplicações biomédicas, incluindo-se aquelas inteiramente novas, alcançadas por nanomateriais customizados para obtenção de melhor funcionalidade, sensibilidade, eficiência e especificidade (NAVYA; DAIMA, 2016).

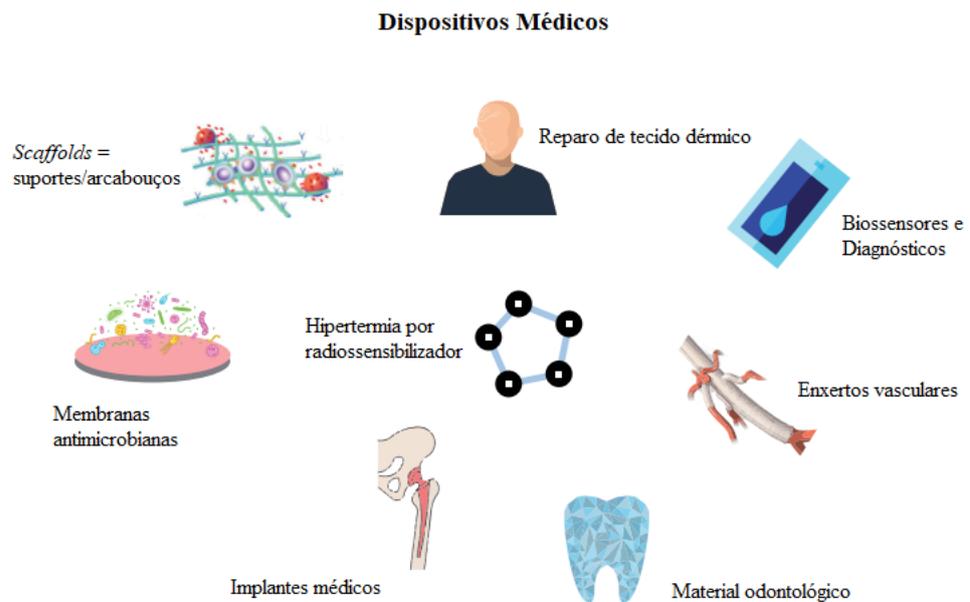
Nesse sentido, o uso de nanomateriais em dispositivos médicos tem se tornado crescente e bastante diverso nos últimos anos, considerando-se não apenas as diversas finalidades clínicas atribuídas e abarcadas por esta categoria de produtos, mas a própria diversidade de nanomateriais, atualmente, disponíveis e neles empregados – conjuntura que tem beneficiado especialidades médicas diversas, mas desafiado a comunidade acadêmica e mesmo, o sistema regulatório global, que não têm conseguido responder a tempo, às demandas e preocupações geradas por essa tecnologia inovadora, especialmente, no que tange aos eventuais riscos nanotoxicológicos dela advindos, resultantes a sua aplicação clínica e ao seu potencial de exposição interna.

Sob essa perspectiva, Halamoda-Kenzaoui, et al. (2019) asseveram que a nanotecnologia utilizada em dispositivos médicos tem potencial para alcançar um amplo espectro de aplicações, estendendo-se desde as áreas de terapia, diagnóstico, monitoramento até a prevenção de doenças. Concepção que a tem tornado uma ferramenta genuinamente

importante ao futuro da medicina, por possibilitar a melhoria de instrumentos existentes e o surgimento de novos dispositivos médicos – mais inteligentes, mais efetivos e mais biocompatíveis (AFSSAPS, 2011).

Na Figura 4 encontram-se representados alguns exemplos das diversas possibilidades de aplicação da nanotecnologia na área de dispositivos médicos, com destaque àqueles pertencentes à categoria Materiais de Uso em Saúde.

Figura 4 - Possibilidades de Aplicação da Nanotecnologia a Dispositivos Médicos



Fonte: Adaptado de (HALAMODA-KENZAOUUI et al., 2019).

Especialmente no que se refere a essa categoria, observa-se que uma grande variedade de biomateriais em nanoescala tem sido empregada na constituição de seus diferentes tipos de produtos, dentre os quais citam-se nanomateriais inorgânicos (que incluem nanopartículas metálicas, óxido metálicas e cerâmicas), orgânicos (constituídos por polímeros degradáveis e não-degradáveis), a base de carbono (como os nanotubos de carbono, fulerenos, grafeno), compósitos (constituídos por combinações de nanomateriais de natureza orgânica, inorgânica ou à base de carbono com qualquer forma de material metálico, cerâmico ou polimérico) (ADABI et al., 2016; JEEVANANDAM et al., 2018; KARAKUS; BILGI; WINKLER, 2020; NAVYA; DAIMA, 2016; RAMOS et al., 2017), além de materiais nanoestruturados (AKÇAN et al., 2020; VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI, 2016) e nanobiomateriais (enquanto estruturas baseadas em lipídios, proteínas ou outras substâncias de ocorrência natural)

(SCENIHR, 2015) – por suas diversas propriedades físicas, magnéticas, de biocompatibilidade, biodegradabilidade, antimicrobianas, de reforço, resistência à tensão, de biomimetização, ampla área de superfície – bastante úteis num cenário de aplicações clínicas diversas como o observado nesse grupo de artigos.

Realidade essa que tem sido, progressivamente, consolidada pelas diferentes estratégias de aplicação e apresentação desses nanomateriais, quando utilizados em materiais de uso em saúde. Dentre as estratégias de aplicação, Geertsma et al. (2015) destacam o recobrimento de superfície, a mimetização de estruturas fisiológicas naturais e a melhoria de propriedades das matérias-primas utilizadas como sendo as mais comumente empregadas nesse meio. Em relação às estratégias de apresentação, referenciam-se as formas livres – em formulações pastosas (como compósitos de preenchimento dentário) ou no produto (como a nanoprata adicionada a curativos); fixas – para formação de recobrimentos em implantes (como a nano-hidroxiapatita) e prevenção de infecções (por recobrimentos a base de nanoprata impregnados em dispositivos invasivos) e; incorporadas para melhoria de propriedades mecânicas (pelo emprego de nanotubos de carbono em paredes de cateter, por exemplo) (SCENIHR, 2015).

Especificamente no que tange às estratégias de aplicação, cumpre ressaltar alguns aspectos:

a) Recobrimento de Superfície

É tido como um dos campos de aplicação mais importantes e diversos da nanotecnologia aplicada a dispositivos médicos, [e por conseguinte à área de materiais de uso em saúde], principalmente, por proporcionar melhoria a sua biocompatibilidade (GEERTSMA et al., 2015).

Destacam-se como principais abordagens utilizadas para o alcance dessa finalidade, os nano recobrimentos e/ou as modificações de superfície, já implementadas em implantes cardiovasculares (*stents*), odontológicos (implantes dentários) e ortopédicos (próteses de quadril) que têm lançado mão desse tipo de recurso para:

- melhoria da biocompatibilidade e hemocompatibilidade, pelo mascaramento da superfície do implante e, conseqüente, minimização de reações adversas (HALAMODA-KENZAOUUI et al., 2019);
- melhoria da interação entre a superfície do implante e o tecido ou osso circunjacentes, diminuindo o risco de perda do implante (HALAMODA-KENZAOUUI et al., 2019);

- formação de barreira e, conseqüente, prevenção contra a migração de íons metálicos (como aqueles liberados do cromo, molibdênio e níquel) que possam deflagrar reações de hipersensibilidade (HALAMODA-KENZAOUİ et al., 2019);
- prevenção de infecção pela ação antimicrobiana de nanomateriais empregados na superfície de curativos, têxteis médicos, cateteres e implantes (ABDI, 2016; GEERTSMA et al., 2015; HALAMODA-KENZAOUİ et al., 2019); e
- modificação de superfície para liberação controlada e prolongada de fármacos em sítios específicos, viabilizada por estruturas metálicas nanoporosas ou pela adição de nanopartículas poliméricas reabsorvíveis, tal como já ocorre em alguns stents farmacológicos (ABDI, 2016; GEERTSMA et al., 2015; HALAMODA-KENZAOUİ et al., 2019).

b) Mimetização de Estruturas Fisiológicas Naturais

Constitui-se como tendência, principalmente, aplicada ao campo de engenharia de tecidos, viabilizada pelo uso de nanomateriais submetidos a tratamento químico ou topográfico, com vistas à mimetização de estruturas de ocorrência natural como os tecidos biológicos, e alcance de propriedades biológicas, físicas e mecânicas ótimas (ABDI, 2016; GEERTSMA et al., 2015; KARAKUS; BILGI; WINKLER, 2020).

No âmbito de materiais de uso em saúde, essa tem sido uma estratégia comumente utilizada nas áreas de ortopedia e odontologia; assim como para suporte a processos de cicatrização e regeneração tecidual (ABDI, 2016; GEERTSMA et al., 2015).

Em ortopedia, os nanomateriais são usados como matrizes para regeneração óssea, por favorecerem a adesão celular, estimularem o crescimento e integração óssea, além de conferirem maior força mecânica à estrutura (HALAMODA-KENZAOUİ et al., 2019). Quanto à odontologia, a aplicação de superfícies nanoestruturadas e modificações da química de superfície têm sido empregadas para proporcionarem melhores respostas celulares, como adesão, crescimento, sobrevivência e diferenciação – necessárias tanto a uma melhor osseointegração como à redução do tempo de cicatrização (RASOULI; BARHOUM; ULUDAG, 2018).

No âmbito de tecidos e substitutos biomiméticos, várias nanopartículas, suportes nanoporosos, superfícies nanomodeladas, nanofibras e nanotubos de carbono estão sendo empregados na fabricação de arcabouços engenheirados para reparo de órgãos e tecidos danificados (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI, 2016). Para cicatrização, o uso de nanomateriais como substitutos dérmicos que mimetizem a matriz extracelular para fornecer

um microambiente favorável ao crescimento celular e cura da ferida tem sido observado. *Scaffolds* (suportes/arcabouços) apresentados sob a forma de matrizes ou implantes nanoestruturados para estímulo à migração, fixação e multiplicação celular têm figurado como candidatos biomiméticos interessantes ao processo de regeneração tecidual (ABDI, 2016; HALAMODA-KENZAOUI et al., 2019).

c) Melhoria de Propriedades das Matérias-Primas

Mostra-se como estratégia comumente empregada na fabricação de dispositivos médicos utilizados em cirúrgica, com o intuito de torná-los mais fortes, leves e afiados, e assim reduzir o dano tecidual (HALAMODA-KENZAOUI et al., 2019); encontrando também espaço nas áreas de odontologia e ortopedia.

Em odontologia, os nanomateriais têm sido usados em preenchimentos dentários e de canais radiculares para melhoria das propriedades físicas e mecânicas pelo aumento da resistência à microtração e flexão, da resistência à fratura e da dureza do material (GEERTSMA et al., 2015). Já em ortopedia, nanocompósitos de carbono contendo matriz cerâmica ou polimérica têm sido empregados para melhoria de propriedades mecânicas (AKÇAN et al., 2020).

Ademais, pesquisas relacionadas à aplicação de nanotubos de carbono têm evidenciado sua atratividade para uso em materiais compósitos reforçados com fibras devido a sua alta relação de aspecto – característica aplicável a fibras e partículas alongadas, no que tange à proporção de dimensão externa estabelecida entre a partícula mais longa e a partícula mais curta (ISO, 2012), combinada com excelentes propriedades mecânicas e elétricas.

A partir do panorama apresentado sobre como a nanotecnologia tem sido aplicada à área de materiais de uso em saúde, enquanto categoria de dispositivos médicos, e sua representatividade dentro das diversas especialidades em que esses dispositivos têm sido utilizados, algumas considerações relacionadas à abordagem regulatória aplicada a esse tipo de produto fazem-se oportunas.

Conforme asseverado por Halamoda-Kenzaoui, Blanka (2019), até o momento, não existe estrutura regulatória específica para produtos de base nanotecnológica utilizados em saúde, dentre os quais incluem-se os dispositivos médicos, e sua subcategoria, materiais de uso em saúde – condição que tem imposto a necessidade de desenvolvimento e incorporação de diretrizes adicionais à prática regulatória atual [baseada na regulação existente], que abarquem suas particularidades [físico-químicas e biológicas].

Como anteriormente antecipado, a análise regulatória aplicada a materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais tem sido pautada por regulamentos gerais aplicáveis a essa categoria de produtos, frente a não edição de regulamentação nano-específica (realidade comum a maioria das jurisdições ao redor do globo), fato que tem justificado a adoção de uma abordagem de análise do tipo caso a caso, baseada no estado evolutivo da ciência em relação à nanotecnologia aplicada e, por conseguinte, resultado em uma avaliação mais cautelosa e centrada nas peculiaridades nano-específicas apresentadas por cada dispositivo, incluindo-se suas eventuais repercussões clínicas, usualmente, relacionadas aos diferenciais proporcionados pela tecnologia, assim como aos riscos a ela associados (identificados ao longo do ciclo de vida do produto).

Em termos gerais, essa avaliação contempla o cumprimento de requisitos documentais, previstos nos regulamentos sanitários vigentes (especialmente no que tange aos requisitos mínimos de segurança e eficácia), e em normas técnicas de referência aplicáveis a materiais de uso em saúde e relacionadas à Nanotecnologia e a nanomateriais.

Contudo, considerando-se o conhecimento ainda incompleto e, por vezes, inconsistente relacionado à toxicidade dos nanomateriais empregados na constituição dessa categoria de produtos – análises pontuais quanto à existência de evidências suficientes que suportem o atendimento dos requisitos de segurança e eficácia desses produtos tornam-se necessárias, partindo-se do pressuposto de que, cada nanomaterial aplicado a cada tipo de dispositivo médico deve, a princípio, ser considerado como único, não sendo seus dados de identidade, caracterização de propriedades físico-químicas e de segurança biológica, bem como de riscos identificados transponíveis ou extrapoláveis a outros produtos e contextos de utilização diversos. Motivo pelo qual cada caso deve ser considerado individualmente, em um contexto de gerenciamento de risco, que deve contemplar desde os potenciais riscos relacionados ao nanomaterial incorporado, como àqueles advindos e resultantes ao uso do próprio “nano produto” durante seu ciclo de vida.

Isso porque a toxicidade de nanomateriais pode ser influenciada por diversos fatores intrínsecos ao próprio material e, a ele extrínsecos, relacionados à via e frequência de exposição, resposta biológica deflagrada no organismo do hospedeiro, tempo de contato/permanência no corpo, eventual lixiviação, deslocamento e deposição em outras regiões do corpo ao longo do tempo – realidade que requer a adoção de uma abordagem regulatória mais cuidadosa no processo de análise e regularização de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais.

Em assim sendo, o quesito segurança alcança importância singular no âmbito da Nanomedicina, aqui representada sob a perspectiva de dispositivos médicos categorizados como materiais de uso em saúde que contenham nanomateriais, principalmente, sob a forma livre ou que, porventura, possam ser liberados de sua estrutura e interagir com o meio biológico interno, frente ao seu potencial para desencadear respostas e eventos indesejáveis ao organismo humano.

Por esse motivo, dentre os aspectos objeto de maior interesse regulatório no âmbito de dispositivos que possuam nanomateriais em sua composição, está a demonstração de sua segurança, atestada pela condução de extensivas e criteriosas análises de identificação e caracterização físico-química e topográfica do nanomaterial (enquanto matéria-prima e sob as condições fisiológicas pretendidas) e, de sua forma aplicada ao dispositivo (quanto a sua estabilidade no produto, sua eventual interação físico-química com outros materiais constituintes do produto e seu comportamento biológico, quando exposto ao ambiente biológico interno) – combinadas a avaliações nanotoxicológicas de triagem para o nanomaterial objeto de interesse e, de segurança biológica do produto acabado, estabelecida nos termos do disposto pela série de normas ISO 10993, conforme rota de exposição, uso pretendido, nível e tempo de contato do produto no organismo, e forma de apresentação do nanomaterial nele contido. Para que a partir desse conjunto de informações, possa-se estimar e avaliar os riscos biológicos identificados e determinar a relação risco-benefício do dispositivo de base nanotecnológica no contexto de sua utilização clínica prevista.

Cabe ponderar que, embora as preocupações quanto à segurança e biocompatibilidade de nanomateriais em aplicações biomédicas sejam preponderantes (ADABI et al., 2016), avaliações dos requisitos de eficácia – não contempladas no escopo do presente trabalho, e em geral, relacionadas ao desempenho e funcionalidade do produto, são imperativas ao alcance de uma análise completa e abrangente da tecnologia objeto de interesse, inclusive no que concerne à comprovação das alegações a ela atribuídas.

4.2 AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA BIOLÓGICA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE DE BASE NANOTECNOLÓGICA, SOB UMA PERSPECTIVA DE RISCO

Embora a Nanotecnologia tenha demonstrado potencial revolucionário no âmbito de aplicação biomédico (INGLE; GUPTA; RAI, 2020) viabilizado, principalmente, pelo uso e incorporação de nanomateriais engenheirados de características novas, úteis e únicas a dispositivos de finalidades diversas; observa-se que preocupações toxicológicas relacionadas ao potencial dessas mesmas características deflagarem repercussões biológicas adversas resultantes às nanobiointerações no organismo têm mobilizado esforços científicos crescentes na busca por adequabilidade e maior sistematização metodológica às avaliações nanotoxicológicas requeridas para o alcance de uma melhor compreensão dos complexos processos de interação nanobiológica e mecanismos de toxicidade deflagrados.

Contudo, muitos são os desafios relacionados a esse recente campo do conhecimento, em franco processo de expansão e consolidação, mas fortemente marcado por limitações de ordem técnica, científica, procedimental que têm, indubitavelmente, comprometido seu avanço sob bases sólidas o suficiente para aprimorar e desenvolver metodologias, ferramentas e equipamentos mais sensíveis e específicos à avaliação de nanomateriais, evoluir na redução de lacunas, bem como produzir informações qualificadas e confiáveis para progressão de modelos preditivos que suportem não só a racionalização de recursos e tempo, mas a própria tomada de decisão sob bases científicas consistentes, inclusive no âmbito regulatório.

Nesse cenário, construir e consolidar um entendimento abrangente da realidade nanotoxicológica geral e aplicada ao contexto de dispositivos médicos, com enfoque em materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, de modo não apenas a assimilar seu *status*, mas vislumbrar e acompanhar tendências futuras, enquanto oportunidades de avanço no campo da Nanotoxicologia aplicada à área da saúde – torna-se imperativo e necessário.

Por esse motivo, o presente capítulo foi estruturado em outros seis subcapítulos, para que tópicos relevantes a uma compreensão ampliada sobre todo esse contexto pudessem ser abordados. Dentre eles destacam-se aqueles dedicados à contextualização da nanotoxicologia aplicada a dispositivos médicos, ao processo de caracterização físico-química de nanomateriais e à avaliação de segurança biológica, enquanto temas centrais ao escopo desta dissertação, sem

que outros temas de interesse, relacionados à avaliação de risco, regulação, desafios nanotoxicológicos e nanotoxicologia preditiva deixassem de ser contemplados.

4.2.1 Nanotoxicologia Aplicada a Dispositivos Médicos

Devido ao seu potencial de exposição e de interação com os sistemas biológicos, dispositivos médicos, assim como outras categorias de produtos de aplicação médica, despertam grande preocupação quanto a sua segurança e potenciais riscos à saúde humana, tendo se tornado alvos de maior vigilância nos últimos anos frente ao avanço do conhecimento científico, surgimento e incorporação de novas tecnologias.

Nesse cenário, dispositivos médicos de base nanotecnológica, em geral, caracterizados pela implementação de modificações de superfície [topográficas, de propriedades e deposição de recobrimentos], por melhorias de desempenho e, no caso de dispositivos médicos combinados (ou seja, que associam ação física/mecânica a propriedades farmacológicas e/ou biológicas) por melhorias de estabilidade na formulação, aumento de solubilidade do excipiente ou redução de excipientes aplicáveis – têm se beneficiado do uso da nanotecnologia para redução de sua toxicidade (AI et al., 2011; HOBSON et al., 2016; JUILLERAT-JEANNERET et al., 2015); assim como para avanço nos campos diagnóstico e terapêutico, por meio de plataformas nanoteranósticas (RADOMSKA; LESZCZY SZYN; RADOMSKI, 2016), que têm ganhado relevância e destaque nos últimos anos, enquanto estratégias combinadas para otimização de tratamentos como o de hipertermia, pelo uso de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (*SPIONs*)¹⁴, por exemplo.

Contudo, apesar do rápido crescimento no uso de nanomateriais em medicina, de modo geral, existe uma importante carência de informação disponível para predizer os efeitos à saúde relacionados à exposição a esse tipo de material, o que se reflete no contexto regulatório, que ainda trata a maioria dos materiais em nanoescala da mesma forma que as substâncias químicas convencionais, não havendo, portanto, consenso ou diretrizes nano-específicas claras para sua regulação – fato que pode ser constatado frente aos procedimentos regulatórios atuais adotados para aprovação de novos medicamentos e para dispositivos médicos, também aplicados a medicamentos e dispositivos médicos de base nanotecnológica (JUILLERAT-JEANNERET et

¹⁴ Original: *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)*.

al., 2015), baseados em abordagem de análise do tipo caso a caso (RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

Juillerat-Jeanneret et al (2015) apontam como fatores a se considerar na avaliação do uso de nanomateriais em Nanomedicina: tamanho, esquema de exposição, dose, população envolvida e a duração do tempo de exposição (aguda ou crônica); sendo a toxicidade, biotransformação e biodistribuição desses materiais no organismo, também destacadas como questões importantes, apesar de ainda não resolvidas pelas esferas científica e regulatória. Para tanto, conhecimento aprofundado a respeito das propriedades físico-químicas do nanomaterial objeto de interesse e de seus aspectos biológicos resultantes às nanobiointerações torna-se imperativo, segundo Navya & Daima (2016) – que além de salientarem algumas propriedades físico-químicas importantes (tais com tamanho, composição, forma/morfologia, relação superfície/volume, agregação, estabilidade, proteína corona) e negligenciadas (pureza, presença de contaminantes residuais, hidrofiliicidade/hidrofobicidade, defeitos de superfície) no cenário biomédico, também pontuam preocupações quanto às potenciais repercussões por elas deflagradas, quando em ambiente fisiológico (tais como hemólise, ativação de trombóticos, captação de nanomateriais e mecanismos de morte celular).

Aspecto importante, considerado por Ai et al. (2011) refere-se a dispositivos que exponham o organismo a nanomateriais “não ligados”, ou seja, que se desprendam e se tornem biodisponíveis para interações nano-biológicas, especialmente, aqueles de maior longevidade no organismo. Ademais, cumpre enfatizar que a depender da natureza das nanopartículas empregadas no produto – se orgânicas, biodegradáveis ou inorgânicas, não-biodegradáveis – diferentes serão os níveis de preocupação desencadeados, haja vista que os primeiros, por serem degradados pelas vias metabólicas, tendem a gerar menor preocupação; enquanto os últimos, por sua baixa solubilidade e potencial para persistência e exposição por períodos prolongados despertam maior atenção (RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016) – condição essa traduzida sob a forma de uma avaliação de segurança mais extensa e completa.

No que tange à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica [dentre os quais se incluem aqueles pertencentes à categoria de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais] cumpre pontuar que essa é pautada por abordagem do tipo caso a caso, respaldada por regulamentos vigentes, cujo escopo comporte as especificidades e riscos teóricos associados aos nanomateriais (AI et al., 2011). Para tanto, uma variedade de configurações de testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* deve ser conduzida para compreensão do tipo e escala de interações estabelecidas entre nanomaterial e hospedeiro, apesar da inexistência de padrões harmonizados para avaliação de toxicidade e

biocompatibilidade de nanomateriais em sistemas biológicos, segundo asseverado por Adabi et al. (2016).

Sobre esse quesito, cabe pontuar que, frente às propriedades físico-químicas e biológicas diferenciadas e desafios únicos impostos pelos nanomateriais aos testes *in vitro*, Myers et al. (2017) sinalizam para adoção de abordagem cautelosa na condução de teste de avaliação de segurança biológica *in vitro* para análise de dispositivos médicos que contenham nanomateriais, já que versões modificadas desses testes podem ser necessárias para evitar possíveis interferências (a serem previamente determinadas) e leitura imprecisa de resultados. Outro ponto relevante considerado pelos autores, a ser observado nesse contexto de avaliação, relaciona-se à verificação de potencial contaminação por endotoxinas, caracterização de resíduos de manufatura, bem como avaliação de esterilidade, consistência lote a lote e possível sobredose de nanomateriais em testes *in vitro* – enquanto possíveis fatores desencadeadores da toxicidade observada.

Especificamente no que se refere a dispositivos médicos implantáveis (de modo geral), outro elemento que merece destaque, relaciona-se à eventual geração e liberação de íons, produtos de degradação e partículas, predominantemente nanométricas, sob a forma de detritos resultantes a processos de corrosão e desgaste; e seu potencial inflamatório e imunogênico nos tecidos circunjacentes ao implante, bem como de disseminação a sítios secundários e transposição de barreiras biológicas – conjuntura cujos riscos não podem ser negligenciados (BILLI; CAMPBELL, 2010; KEEGAN; LEARMONTH; CASE, 2008; MYLLYNEN, 2009). Nesse cenário, ponderação relacionada ao potencial impacto da proteína corona sobre o efeito patofisiológico desses detritos de desgaste (por sua composição química e conformação estrutural) e seu necessário mapeamento e compreensão a nível de nanobiointerface é realizada por Bitounis et al. (2015).

Nessa perspectiva, a caracterização adicional dos detritos liberados por esses dispositivos e a avaliação dos seus potenciais efeitos toxicológicos ganharam relevância e se tornaram recomendáveis (KEEGAN; LEARMONTH; CASE, 2008) tanto no contexto de dispositivos médicos constituídos por nanomateriais como daqueles que não os possuam, haja vista ser esse um mecanismo de geração incidental de nano-objetos.

Faz-se oportuno ponderar que lacunas de conhecimento relacionadas aos mecanismos biológicos, modos de ação e toxicocinética de nanomateriais no organismo humano, também figuram como desafios a serem superados na avaliação dos impactos biológicos dos nanomateriais utilizados em Nanomedicina (JUILLERAT-JEANNERET et al., 2015; NAVYA; DAIMA, 2016). Pode-se dizer, portanto, que o conhecimento sobre as interações de

nanomateriais com os sistemas biológicos permanece limitado, havendo ainda grande controvérsia sobre a influência de diferentes parâmetros relacionados às propriedades dos nanomateriais em sua toxicidade e segurança (ADABI et al., 2016).

4.2.2 Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração

As atividades de identificação e caracterização de nanomateriais constituem-se como etapas iniciais e indispensáveis a serem consideradas num processo de avaliação toxicológica de nanomateriais (DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009), já que a partir da análise de seus resultados e perigos identificados, associada à forma de apresentação desse material no dispositivo médico, é que se avaliará, sob uma perspectiva de risco, as análises nanotoxicológicas necessárias a nível pré-clínico, para determinação da segurança biológica do material de uso em saúde que contenha ou seja constituído por nanomaterial conforme sua utilização clínica pretendida. Em assim sendo, condução apropriada do processo de nano caracterização torna-se fundamental à obtenção de resultados experimentais confiáveis e reprodutíveis (DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009).

Trata-se, portanto, de processo imprescindível à compreensão de fatores que determinam o comportamento biológico (AFSSAPS, 2011), haja vista o grande número de propriedades físico-químicas capazes de influenciar a toxicidade de nanomateriais – que combinadas à diversidade de apresentações engenheiradas disponíveis e em fase de desenvolvimento, têm desafiado a análise de risco associada a nanomateriais.

Isso porque, além da natureza do nanomaterial objeto de interesse (representada por suas propriedades físico-químicas intrínsecas e responsáveis por sua identidade sintética), devem ser levados em consideração sua finalidade e contexto de exposição clínica, quando incorporado a um produto de uso médico – motivo pelo qual suas propriedades extrínsecas, manifestas em sistemas biológicos, devem ser necessariamente contempladas no processo de caracterização físico-química. Tal prática mostra-se imprescindível à obtenção de conhecimento mais abrangente e aprofundado sobre o comportamento assumido por nanomateriais em apresentações “secas” (também conhecidas como pristina, original, sintetizada), “molhadas” (em suspensão) e “*in situ*” (*in vivo*), constituindo-se também como um subsídio importante à adequada interpretação de dados toxicológicos no contexto de aplicação pretendida, conforme

discutido por SAYES & WARHEIT (2009), Johnston et al. (2012), Fadeel et al. (2015), Dusinska et al. (2015), Forest & Pourchez (2017), Shannahan (2017) e Wolfram et al. (2014).

Concepção essa corroborada por Singh et al. (2019), que destacam como um dos desafios enfrentados pela nanotoxicologia, a predominância de experimentos realizados com nanomateriais sob sua forma original (pristina), que por desconsiderarem o cenário da complexa dinâmica de superfície ocorrida durante a exposição do nanomaterial a matrizes biológicas, comprometem a identificação e extrapolação de riscos (detectados *in vitro*) a situações de exposição fisiológica realistas. Dinâmica essa que configura o que, convencionalmente, se denomina proteína corona, também conhecida como biocorona – fenômeno resultante à alta energia de superfície de nanomateriais que em contato com ambientes biológicos adsorvem biomoléculas a sua superfície, formando sobre ela uma espécie de recobrimento biológico – real responsável pela identidade biológica do nanomaterial (WESTMEIER; STAUBER; DOCTER, 2015).

Por seu caráter mutável e dependente das propriedades físico-químicas únicas das nanopartículas, das características do sistema biológico avaliado (tipo de meio, composição, concentração, tempo de circulação, velocidade, pressão) e da via de exposição escolhida – a biocorona pode afetar o comportamento, as interações e mesmo, a toxicidade do nanomaterial ao longo do seu ciclo de vida – haja vista a influência da entidade “nanomaterial-corona” sobre as vias de sinalização celular, o processo de captura celular, a resposta imunológica deflagrada, a biodistribuição, o destino biológico, bem como a deposição/acúmulo em órgãos-alvo secundários, biodegradação e eliminação do nanomaterial exposto (BAIMANOV; CAI; CHEN, 2019; CAI et al., 2020; DOCTER et al., 2015; FOREST; POURCHEZ, 2017; HUSSAIN et al., 2015; JOHNSTON et al., 2012; LIU; WORKALEMAHU; JIANG, 2017; NEAGU et al., 2017; OVAIS et al., 2020; SHANNAHAN, 2017; WESTMEIER; STAUBER; DOCTER, 2015; WOLFRAM et al., 2014).

Assim, ela passa a ser compreendida como veículo de identificação imunológica, por conferir ao nanomaterial ao qual está ancorada, uma espécie de assinatura molecular passível de reconhecimento pelo sistema imunológico inato, sendo sua composição determinante ao modo e às vias de interação assumidas pela nanopartícula a nível celular, bem como para os processos locais e sistêmicos deflagrados, contribuindo sobremaneira para um ou outro desfecho: biocompatibilidade ou desencadeamento de efeitos adversos (NEAGU et al., 2017).

Nesse sentido, compreender as propriedades resultantes à formação dessa entidade torna-se condição fundamental ao entendimento da interface e interação nanobiológica, sendo sua adequada caracterização, por meio de metodologias analíticas que viabilizem sua detecção,

estudo de sua formação e composição, imperativa à identificação das principais propriedades físico-químicas relacionadas a efeitos de perigo, a uma interpretação mais assertiva das relações estrutura-atividade, bem como à compreensão de sua relevância patobiológica no contexto de aplicação biomédica, com vistas ao desenvolvimento de produtos nanotecnológicos seguros e funcionais (BAIMANOV; CAI; CHEN, 2019; DOCTER et al., 2015; NEAGU et al., 2017; OVAIS et al., 2020), inclusive, por meio da adoção de estratégias relacionadas ao conceito “*safe by design*”, representadas por abordagens de recobrimento de superfície, controle de formato, dopagem, passivação de superfície, funcionalização de superfície (pela incorporação de grupos químicos), padronização de tamanho para reduzir defeitos superficiais e de ligações imperfeitas (BURELLO; WORTH, 2015; CAI et al., 2020; DOCTER et al., 2015; HU et al., 2017; NEAGU et al., 2017) – de modo a minimizar potenciais riscos à saúde e preservar ou aprimorar propriedades funcionais desejáveis (HJORTH; VAN HOVE; WICKSON, 2017).

Alcançada a relevância desse fenômeno e sua indissociabilidade biológica no contexto de aplicações biomédicas, como aquele em que materiais de uso em saúde se inserem; e partindo-se para um contexto normativo baseado em diretrizes de caracterização físico-química aplicadas a nanomateriais engenheirados para fins de avaliação toxicológica, tal como aquele apresentado pela norma técnica de referência ISO/TR 13014: 2012, intitulada “*Nanotechnologies – Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment*”¹⁵, identifica-se um amplo escopo de características passíveis de análise, que abarcam desde as propriedades intrínsecas (tais como os atributos físico-químicos) e extrínsecas (resultantes à interação com o meio) do nanomaterial, bem como de seus agregados e aglomerados (maiores que 100 nm) (ISO, 2012; ISO, 2011).

Nos termos da referida norma seriam consideradas características físico-químicas relevantes à avaliação toxicológica de nanomateriais:

a) Descrição Física:

- Tamanho de Partícula/Distribuição de Tamanho;
- Estado de Agregação/Aglomeração em meio relevante;
- Formato;
- Área de Superfície/ Área de Superfície Específica.

b) Composição Química:

- Composição;

¹⁵ Tradução nossa: Nanotecnologias – Diretrizes em Caracterização Físico-Química de Materiais em Nanoescala Engenheirados para Avaliação Toxicológica (ISO, 2012).

- Pureza;
- Química de Superfície.

c) Propriedades Extrínsecas:

- Carga de Superfície;
- Solubilidade;
- Dispersabilidade.

Trata-se de uma relação de características gerais a serem consideradas, conforme a natureza do nanomaterial a ser avaliado, mas de grande valia à fundamentação e direcionamento de um plano de caracterização que seja capaz de subsidiar a etapa de avaliação toxicológica, já que as informações obtidas pela análise dos atributos elencados na referida norma poderiam contribuir para o delineamento de uma triagem toxicológica, e posterior avaliação nanotoxicológica, mais específica e completa, conforme aplicação e cenário de exposição esperado para o nanomaterial objeto de interesse empregado no produto acabado.

No que concerne à análise e caracterização de nanomateriais utilizados em dispositivos médicos, segundo disposições constantes no documento SCENIHR (2015), seriam considerados atributos relevantes e, potencialmente, atrelados às características, finalidade de uso e desempenho do produto no qual esses estariam contidos:

- Identidade e Composição Química;
- Tamanho de Partícula (primária e secundária);
- Concentração de Massa e Partícula;
- Área de Superfície Específica;
- Química de Superfície;
- Carga de Superfície;
- Solubilidade e Propriedades de Partição (fase orgânica e aquosa);
- pH;
- Viscosidade;
- Densidade e Densidade de Poros;
- Poeira (produtos em pó seco);
- Reatividade Química/Atividade Catalítica;
- Atividade Fotocatalítica.

Já a norma ISO/TR 10993-22: (2017a), que dispõe sobre diretrizes à avaliação de biocompatibilidade de dispositivos médicos que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, considera a caracterização de propriedades adicionais a depender do *design*, uso pretendido e características de desgaste apresentados pelo dispositivo, tais como:

- Cristalinidade;
- Porosidade;
- Potencial *redox*;
- Fotocatálise;
- Potencial Formação de Radicais;
- Coeficiente de partição em água/octanol (que pode não ser aplicável a materiais sólidos).

Condição que não exclui a adoção de diretrizes específicas e, eventualmente, disponíveis para caracterização de determinados tipos de nanomateriais. Ademais, outros aspectos importantes considerados pela norma ISO/TR 10993-22 (2017a) referem-se:

a) à incorporação de superfícies nanoestruturadas em dispositivos médicos que requer, além de caracterização físico-química, caracterização topográfica, cujos atributos são estabelecidos com base na aplicação clínica proposta para o dispositivo, dentre os quais citam-se:

- rugosidade;
- diferença de área de superfície (diferença entre área de superfície real e área de superfície projetada, considerando-se o aumento da área de superfície total causada pela rugosidade);
- contagem e caracterização de picos (tais como altura e distância entre picos – enquanto importantes parâmetros espaciais); e

b) ao emprego de materiais nanoporosos em dispositivos médicos (como sistemas de entrega de fármacos e para constituição de arcabouços teciduais), cuja caracterização possa contemplar:

- tamanho e estrutura de poros ou vazios;
- sua densidade e distribuição.

Questão atinente à realidade de dispositivos médicos, bem como de materiais de uso em saúde, de natureza nanotecnológica ou não, e que merece destaque, relaciona-se à possibilidade de geração de nano-objetos por desgaste ou degradação em meio biológico, resultante aos processos de manufatura e processamento, ou ao próprio contexto de uso e aplicação do produto – condição a ser investigada e devidamente caracterizada, sempre que necessário (ISO, 2017a).

No Quadro 5 foram consolidados os atributos destacados por cada uma das referências supramencionadas, cuja pertinência e aplicabilidade ao processo de caracterização físico-química de nanomateriais contidos em materiais de uso em saúde deverão ser avaliadas conforme a forma de apresentação do nanomaterial e sua finalidade no dispositivo. Ressalta-se que esta é uma relação não exaustiva e não taxativa podendo, portanto, ser complementada por outros parâmetros relevantes identificados em consulta a outras normas técnicas ou à literatura corrente; bem como não ser plenamente aplicável a depender do caso concreto.

Quadro 5 - Consolidação de atributos físico-químicos aplicáveis ao processo de caracterização de nanomateriais contidos em Materiais de Uso em Saúde, segundo as normas técnicas ISO/TR 13014 (2012), ISO/TR 10993-22 (2017a) e documento SCENIHR (2015)

Características físico-químicas e topográficas de nanomateriais contidos em materiais de uso em saúde passíveis de avaliação		
Tamanho de Partícula	Identidade	Densidade
Distribuição de Tamanho	Cristalinidade	Solubilidade e Propriedades de Partição
Estado de Agregação/Aglomeração	Carga de superfície	Dispersabilidade
Área de Superfície/Área de Superfície Específica	Reatividade Química/Atividade Catalítica	pH
Formato	Atividade Fotocatalítica	Poeira (produtos em pó seco)
Química de Superfície	Potencial Formação de Radicais	Rugosidade (caracterização e diferença de área de superfície)
Composição	Concentração de Massa e Partícula	Porosidade (tamanho, estrutura, densidade e distribuição de poros)
Pureza	Viscosidade	Nano-objetos gerados por desgaste/degradação

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Frente à relevância desses atributos, algumas considerações fazem-se oportunas e serão a seguir realizadas:

a) Tamanho e Distribuição de Tamanho:

É tido como característica fundamental a todos os nanomateriais. Por convenção, o intervalo de tamanho estabelecido entre 1 e 100 nm, é o mais comumente utilizado em referência aos nanomateriais, embora não haja, sob uma perspectiva química ou biológica, uma demarcação claramente estabelecida para esses valores (BOVERHOF et al., 2015). Percepção corroborada por Miernicki, et al. (2019), que também discute sobre a pertinência dos limites de tamanho estabelecidos, mais relacionados a questões regulatórias que razões propriamente científicas.

Em relação ao limite inferior da nanoescala (de 1 nm), tem-se que as características e propriedades do material são amplamente definidas pela química da molécula e não pela natureza física dos materiais formados em nanoescala. Já quanto ao limite superior (de 100 nm), este seria um valor de corte “arbitrário”, visto que as características físico-químicas e biológicas tamanho-dependentes dos materiais não mudariam abruptamente, ultrapassado esse marco (BOVERHOF et al., 2015; SOARES et al., 2018).

Nesse sentido, em uma tentativa de incluir todas as características importantes sob o ponto de vista regulatório, algumas autoridades expandiram o limite superior da nanoescala para além dos 100 nm (HEALTH CANADA, 2011; USFDA, 2014a). No entanto, vale considerar que a maioria das autoridades regulatórias têm usado o intervalo de 1 a 100 nm como definição de nanoescala, demonstrando consistência com a norma ISO/TS 80004-2 (2015a), que estabelece terminologias e definições aplicadas à Nanotecnologia.

Embora os limites de tamanho sejam reconhecidamente arbitrários, há concordância de que qualquer fenômeno nano-específico único tem maior probabilidade de ocorrer em nanomateriais situados dentro da faixa de 1 a 100 nm, sendo esse intervalo, portanto, razoável (BOVERHOF et al., 2015). Por outro lado, reconhece-se ainda que, o tamanho da partícula sozinho não é suficiente para a avaliação de um nanomaterial, devendo-se levar em consideração a inclusão de outros critérios importantes.

Aspecto também relevante a ser considerado em relação ao tamanho do nanomaterial, é a sua potencial influência sobre eventuais efeitos toxicológicos observados. Segundo Hussain et al. (2015), o tamanho da partícula primária é, indiscutivelmente, a propriedade mais crítica em uma resposta nanotoxicológica, uma vez que influencia significativamente o modo e a extensão da interação celular.

Por isso, estabelecer as características de distribuição de tamanho das partículas mostra-se fundamental à obtenção e aplicação de nanomateriais seguros à finalidade de uso em saúde proposta.

Nesse sentido, a distribuição de tamanho em torno da média ou mediana é tida como aspecto prático adicional à compreensão de como o tamanho define um nano-objeto ou nanomaterial (BOVERHOF et al., 2015).

Segundo Bleeker et al. (2013), a inclusão de um valor de corte para distribuição de tamanho, como um componente na definição de nanomaterial, mostra-se como parâmetro necessário à obtenção de maior clareza quanto ao que deve ou não ser considerado nanomaterial. Para tanto, consistência quanto à escolha da variável a ser adotada (percentual de peso ou contagem do número de partículas) é imperativa.

Por fim, ressalta-se que toda caracterização de nanomateriais inclua informações relacionadas ao tamanho medido, a incerteza da medição, a distribuição de tamanho observada e os métodos utilizados no processo de mensuração (AFSSAPS, 2011), para que essas possam ser comparadas às informações fornecidas pelo fabricante da matéria-prima; e tomadas como referência a avaliações futuras e, eventual identificação de mudanças ocorridas ao longo do tempo ou relacionadas ao ambiente.

b) Estado de Agregação/Aglomeração:

Os agregados são estruturas robustas e essencialmente indivisíveis, similares a partículas primárias. Já os aglomerados mostram-se como uma coleção de partículas fracamente ligadas, que podem se decompor por ação de energia externa suficiente. Estes podem variar em tamanho, mas são tipicamente maiores que 100 nm (BOVERHOF et al., 2015).

Partículas secundárias resultantes à formação de agregados ou aglomerados são maiores que suas partículas originárias, condição que pode afetar os comportamentos de absorção, distribuição, metabolismo e exposição inicialmente previstos para o nano-objeto. Especificamente no que tange aos aglomerados, vale destacar sua maior propensão a processos de fragmentação, justamente pela natureza das ligações que os mantêm – condição que pode levar a diferenças toxicológicas entre o material gerado e a “amostra recebida”. Por isso a importância de se determinar o tamanho da partícula em meio biológico relevante, a fim de se ter um valor “como administrado” para posterior comparação “como recebido” (ISO, 2012).

Isso porque, pequenas alterações no meio, tais como pH, força iônica ou concentração podem alterar substancialmente o estado de dispersão das nanopartículas. Por ser este um estado dinâmico, ele deve ser investigado em momentos diferentes para o registro de medidas de distribuição de tamanho em comparação com o estado “ideal” inicial de dispersão, a fim de estabelecer qualitativamente o nível de agregação e aglomeração alcançados (AFSSAPS, 2011).

Por serem parâmetros correlacionados, os estados de agregação e aglomeração de nano-objetos, bem como de dispersabilidade e solubilidade, devem ser conhecidos e considerados, para que eventuais mudanças de estado em meio biológico possam ter suas consequências toxicológicas vislumbradas (AFSSAPS, 2011).

Outrossim, durante o ciclo de vida de aglomerados ou agregados constituídos, partículas podem ser liberadas, condição cujo risco deve ser considerado e avaliado em termos físico-químicos e biológicos.

c) Formato:

Nano-objetos (fabricados) de composição idêntica podem ter uma variedade de formatos (tais como esferas, fibras, pratos), que podem inclusive diferir quanto as suas propriedades físicas, químicas e biológicas devido à conectividade das ligações moleculares. É esperado que o formato dos nano-objetos, agregados e aglomerados tenha efeitos sobre a cinética de deposição e absorção no organismo (ISO, 2012), bem como impacto sobre a estabilidade, transporte, adsorção de superfície e captura por sistemas biológicos (SINGH et al., 2019).

d) Área de Superfície/Área de Superfície Massa-Específica/Superfície de Área Volume-Específico:

A área de superfície específica refere-se à superfície exposta de um material, sendo essa caracterizada pela proporção entre a área de superfície e a massa do material estudado. Uma vez que as interações entre nanomateriais e componentes biológicos ocorrem na superfície do nanomaterial (tais como adsorção de proteínas séricas ou de outros elementos biológicos), a determinação da área de superfície específica torna-se vital ao estudo de potenciais efeitos adversos (AFSSAPS, 2011) e, por conseguinte, à avaliação de risco já que ela pode ditar a carga de superfície, por exemplo, o que pode ter consequências diretas sobre o perfil de interação do nanomaterial, rotas de exposição em função da interface ligante-biológica de superfície, bem como mecanismos de toxicidade.

Trata-se, portanto, de um parâmetro particularmente útil, não apenas para descrição de nanopartículas com forte tendência à agregação e aglomeração no frequente cenário de polidispersão dos nanomateriais (constituídos, em geral, por uma ampla variação de tamanhos), mas também para caracterização de superfícies porosas e para distinção entre superfícies interna e externa (AFSSAPS, 2011; BOVERHOF et al., 2015; EUROPEAN COMMISSION, 2011).

e) Composição Química:

De modo geral, o termo “composição” refere-se a todos os parâmetros relevantes usados para descrever a composição de um material, tais como sua composição química, estrutura cristalográfica, estado cristalino, conformação/configuração molecular (AFSSAPS, 2011).

Quanto ao parâmetro composição química, nanomateriais podem ser classificados como partículas orgânicas, inorgânicas, cristalinas ou amorfas (LUTHER, 2004).

A caracterização da composição química deve incluir tanto substâncias/componentes esperados quanto indesejados, tais como as impurezas – adsorvidas à extensa área de superfície do nanomaterial, e advindas de processos de preparação, produção, esterilização e armazenamento do material, já que essas podem além de comprometer, também confundir a análise dos resultados (AFSSAPS, 2011).

Ademais, deve-se também considerar na avaliação do atributo composição, a presença de contaminantes biológicos (tais como as endotoxinas) e químicos – já que ambos podem atuar como confundidores toxicológicos ao deflagrar efeitos adversos não necessariamente relacionados ao nanomaterial (AFSSAPS, 2011).

f) Pureza:

Anteriormente à condução de qualquer teste toxicológico, é importante compreender o material a ser testado, no que tange não apenas as suas características físico-químicas, mas a sua pureza, já que a presença de impurezas pode ser a causa primária de eventos adversos (ISO, 2012), pela geração de instabilidade e mudanças no material ao longo do tempo (SINGH et al., 2019).

Pode-se dizer que um material é puro, quando suas propriedades físico-químicas coincidem com aquelas previamente estabelecidas e registradas em especificações, literatura e outras fontes definidas. Se tecnicamente viável, impurezas relevantes devem ser quimicamente identificadas e ter sua concentração máxima permitida incluída nas especificações do material (ISO, 2012).

g) Química de Superfície:

Inclui qualquer modificação química ou bioquímica que altere a reatividade da superfície ou adicione uma nova funcionalidade ao material (SCENIHR, 2015). Ela depende em particular das moléculas presentes na superfície do nanomaterial. Por isso, sua descrição deve incluir pelo menos detalhes da composição química, e no caso de recobrimentos – sua espessura, homogeneidade, solidez de ancoragem com o núcleo (AFSSAPS, 2011), haja vista

seu impacto sobre a superfície, estabilidade e funcionalidade do nanomaterial (SINGH et al., 2019).

Nano-objetos são frequentemente recobertos com o intuito de minimizar a ocorrência de aglomeração e/ou de outros eventos fisiológicos, como a adsorção proteica, conhecida como “efeito corona” (ISO, 2012), e assim preservar a viabilidade e/ou funcionalidade do nanomaterial – o que se dá por alteração intencional e planejada de sua química de superfície, em geral, direcionada pela aplicação pretendida. Isso porque, a química de superfície regula o mecanismo de contato celular, grau de internalização do nanomaterial e a citotoxicidade resultante (HUSSAIN et al., 2015). Por isso, a superfície de nanomateriais utilizados em dispositivos médicos é, com frequência, modificada ou funcionalizada para melhorar sua biocompatibilidade.

Um indicador de química de superfície é a relativa hidrofiliicidade ou hidrofobicidade de um nano-objeto, agregado ou aglomerado, por controlar o nível de interação da superfície com a água. Tem-se que, em geral, nanomateriais de aplicação biológica são hidrofílicos (ISO, 2012).

Quanto à caracterização da química de superfície, há expressa manifestação quanto a sua realização, preferencialmente, em separado da avaliação de composição química, conforme disposto pela ISO/TR 13014 (2012) – o que é particularmente desafiador, considerando-se que as moléculas de superfície podem sofrer trocas e rearranjos dinâmicos, como por exemplo, com as moléculas presentes no meio de suspensão.

h) Carga de Superfície:

Trata-se de parâmetro útil ao fornecimento de informações relacionadas às propriedades de dispersão do nanomaterial no meio e a sua capacidade de adsorção de íons e partículas biológicas circundantes (AFSSAPS, 2011), além de se constituir como critério chave à determinação de como as nanopartículas interagem com subsistemas biológicos, inclusive no que tange ao seu potencial de captura (SINGH et al., 2019) . Pode-se dizer que a carga de superfície exerce importante influência sobre a toxicocinética dos nanomateriais, que pelas interações desencadeadas pode sofrer alterações ao longo do tempo e a depender das características do ambiente.

O potencial zeta é uma abreviação de potencial eletrocinético em sistemas coloidais, ou seja, é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária do fluido ligado à partícula dispersa (ISO, 2012) – sendo, por isso, utilizado para caracterizar

indiretamente a carga de superfície. Em geral, o potencial zeta de um nanomaterial depende da química de superfície, da espécie adsorvida, do pH e da composição iônica do meio estudado.

Por ser um parâmetro que pode estar relacionado à estabilidade de dispersões coloidais, ele indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes e carregadas similarmente. Para moléculas ou partículas suficientemente pequenas, um alto potencial zeta (positivo ou negativo) confere estabilidade de dispersão (resistência da dispersão em se aglomerar). Por outro lado, quando o potencial zeta é pequeno (positivo ou negativo), a atração excede a repulsão, resultando em quebra e floculação da dispersão pelas interações de *Van der Waals* (ISO, 2012).

A presença de carga eletrostática nas nanopartículas pode influenciar a formação de aglomerados, afetando se e como serão formados (ISO, 2012).

Quando se avaliam os riscos biológicos de um nanomaterial, o potencial zeta é um bom indicador da sua atividade biológica. Um potencial zeta alto (em valores absolutos) indica melhor dispersão em solução, melhor estabilidade e portanto, menor probabilidade de agregação e aglomeração e, potencialmente, menor toxicidade (AFSSAPS, 2011).

i) Solubilidade:

Trata-se de parâmetro essencial à avaliação de riscos biológicos de qualquer material, sendo a baixa solubilidade apontada como preocupação prioritária no contexto de risco humano e ambiental (SCENIHR, 2009).

A solubilidade, tipicamente, depende e aumenta com a temperatura, podendo inclusive ser influenciada pela pressão e pelo pH (ISO, 2012). Fatores como a composição do meio, a força iônica e a presença de ligantes (tais como proteínas, lipídeos ou elementos formados no sangue) também afetam a dissolução, podendo os últimos se ligarem ao nanomaterial e alterar sua cinética de eliminação (RAUSCHER et al., 2012). Outras condições de impacto sobre a solubilidade, elencadas por BORM et al. (2006) e RAUSCHER et al. (2012) incluem arquitetura de superfície, recobrimentos e estado de aglomeração.

Por isso, tanto a solubilidade como a dissolução são importantes características a serem consideradas na avaliação de nanomateriais. Condições como a formação de precipitados em sólidos e a separação em fases entre líquidos e líquido/sólido são fenômenos que evidenciam a falta de solubilidade (ISO, 2012).

Outro aspecto importante a se considerar no contexto da solubilidade, é a difícil distinção, por vezes, entre os estados de dispersão e dissolução de muitos nano-objetos devido ao seu tamanho (ISO, 2012).

Quando se considera a solubilidade para fins regulatórios, a cinética de dissolução será mais importante que a solubilidade total em equilíbrio, já que a taxa de solubilidade determinará a quantidade e a forma da substância disponível para uma possível atividade biológica (BOVERHOF et al., 2015).

Ademais, sob o ponto de vista toxicológico, apresentar solubilidade em meios aquoso e/ou oleoso é uma característica importante, já que a distribuição biológica do material se correlaciona a sua maior ou menor solubilidade nesses meios (ISO, 2012).

j) Dispersabilidade:

O estado de dispersão é um estado dinâmico que deve ser investigado em diferentes momentos pelo registro de medidas de distribuição de tamanho, comparando-se o estado “ideal” inicial de dispersão, com o intuito de se estabelecer, de forma qualitativa, o nível de agregação e aglomeração (AFSSAPS, 2011). Conforme asseverado por Dhawan; Sharma; Parmar (2009), a aglomeração afeta a natureza básica das nanopartículas pelo aumento de seu tamanho e diminuição de sua área de superfície – podendo assim influenciar os resultados de toxicidade do material.

A dispersão de partículas pode se tornar um fator relevante, se durante estudo de toxicidade, respostas imunológicas e inflamatórias a nano-objetos forem tamanho-dependentes (ISO, 2012).

Ademais, aglomeração e reaglomeração de um material podem mascarar a penetração de partículas na membrana celular ou inibir a habilidade de um macrófago de completar a fagocitose. Contudo, a influência da dispersabilidade em resultados de toxicidade ainda não é completamente entendida (ISO, 2012).

Finda essa breve explanação sobre algumas das principais características físico-químicas passíveis de avaliação, cumpre considerar a existência de diversas metodologias analíticas para avaliação dos diferentes parâmetros físico-químicos mencionados que, em geral, não devem ser utilizadas isoladamente, mas de modo complementar, haja vista limitações inerentes a cada metodologia, e sua eventual inaplicabilidade a determinadas apresentações de nanomateriais. Por isso, os métodos selecionados devem ser justificados com base no tipo e forma do nanomaterial, bem como no uso pretendido do dispositivo médico (ISO, 2017).

Nas normas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a) são listadas algumas das metodologias aplicáveis à mensuração das características físico-químicas apresentadas, conforme listado. Informações que, inclusive, vão ao encontro do disposto por Hussain et al

(2015) ao asseverarem que equipamentos de microscopia, espectroscopia, espectrometria e dispositivos de espalhamento de luz seriam essenciais à caracterização eficaz de nanomateriais.

Quadro 6 - Relação de Metodologias Analíticas aplicáveis à mensuração das principais características físico-químicas, segundo as normas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a)

Características físico-químicas	Metodologias aplicáveis
Tamanho de Partícula e Distribuição de Tamanho de Partículas	Espalhamento dinâmico de luz (<i>Dynamic Light Scattering – DLS</i>); Cromatografia por exclusão de tamanho; Microscopia eletrônica de varredura (MEV); Microscopia eletrônica de transmissão (MET); Microscopia de sonda de varredura (MSV); Espectroscopia de Raman; Microscopia Confocal; ...
Estado de Agregação/Aglomerção	Difração por raio-X; Espalhamento dependente de ângulo em diferentes comprimentos de onda; Espalhamento de raios-x de pequeno ângulo; Dispersão de luz estática; Difração de laser; Microscopia eletrônica de transmissão (MET); ...
Morfologia (forma física e estrutura cristalina)	Microscopia eletrônica de varredura (MEV); Microscopia eletrônica de transmissão (TEM); Microscopia de Força Atômica (MFA); Microscopia de sonda de varredura; Técnicas de Escaneamento; ...
Área de Superfície	Métodos baseados em isotermas de adsorção de gás ou líquido [Brunauer-Emmett-Teller (BET) Theory]; Incandescência induzida por laser; ...
Composição Química e Pureza	Fluorescência de raio-X; Espectroscopia fotoeletrônica de raio X; Difração por raios X de Fourier; Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy – FTIR), Espectroscopia Raman e outras espectroscopias de moleculares; Análise de pureza Termogravimétrica; Microscopia eletrônica de varredura (MEV); Ressonância Nuclear Magnética; ...
Química de Superfície	Espectroscopia de elétrons Auger; Espectroscopia fotoeletrônica de raio-X; Espectroscopia de íons de baixa energia; Raman e outras espectroscopias moleculares; Tomografia de sonda atômica 3D; Espectrometria de raios-X dispersiva de energia; ...
Carga de Superfície	Ponto isoelétrico; Espalhamento eletroforético de luz; Eletroforese; ...

Solubilidade/Dispersabilidade	<p>Não existem métodos específicos para avaliação da solubilidade de nano-objetos. Contudo, pode-se reportar a diálise de equilíbrio, espectroscopia de emissão de massa por plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – ICP-MS</i>) ou espectroscopia de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry – ICP-OES</i>) como possíveis métodos de mensuração.</p> <p>Filtração de fluxo tangencial para separação de nanomateriais seguida por detecção apropriada.</p> <p>Métodos para avaliar dispersabilidade de nano-objetos são baseados no tamanho de partícula/distribuição de tamanho e estados de agregação/aglomeração.</p>
Nanoestruturas de Superfície	<p>Interferometria; Reflectometria; Microscopia de sonda de varredura (MSV); Microscopia de força atômica (MFA); Microscopia de varredura por tunelamento (MVT); ...</p>

Fonte: Adaptado de ISO (2012) e ISO (2017a).

Considerando-se que algumas metodologias são “multipropósito”, ou seja, se aplicam à investigação de mais de uma característica físico-química, constata-se que a combinação de vários métodos pode, além de viabilizar a mensuração de um mesmo parâmetro sob perspectivas distintas, permitir a avaliação simultânea de características diferentes, o que pode significar a racionalização de tempo e recursos.

Por outro lado, as limitações técnicas inerentes às metodologias de teste atualmente disponíveis, são uma realidade que tem comprometido o avanço no conhecimento relacionado ao potencial tóxico e aos mecanismos de toxicidade desencadeados por nanomateriais – condição que tem gerado preocupações quanto à confiabilidade dos métodos de mensuração e categorização desses nanomateriais (LAI et al., 2017).

Independentemente do equipamento utilizado, a mensuração por ele fornecida deve ser válida e estabelecida por meio de verificações e amostragens significativas, sendo a escolha dos materiais de referência também crucial nesse contexto (AFSSAPS, 2011).

Outrossim, peculiaridades relacionadas à natureza dos nanomateriais e ao seu próprio processo de caracterização também são apontadas pela norma ISO/TR 13014 (2012) como pontos relevantes a serem considerados no contexto de execução e análise de resultados desse tipo de avaliação, frente ao seu potencial impacto sobre a adequada interpretação dos achados auferidos, são elas:

- Confundidores relacionados a erros de interpretação do que poderia ser considerado uma mensuração acurada, resultantes a artefatos de um sistema teste, ferramentas ou impurezas (ISO, 2012).

- Variabilidade lote a lote de nanomateriais comercialmente disponíveis, resultante à complexidade composicional de nano-objetos e à inobservância dos preceitos de boas práticas de fabricação, conjunção que pode causar diferenças significativas entre os resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* conduzidos a partir de lotes diferentes de um mesmo material (ISO, 2012). Isso porque, variações sutis no tamanho, forma, área e química de superfície, recobrimento, síntese ou formulação de um material em nanoescala podem, substancialmente, afetar sua segurança, atividade e toxicidade (ISO, 2012; SOARES et al., 2018), por influenciarem processos de captura e atividade a nível celular (PARK et al., 2009).

Por oportuno, cumpre ressaltar que além do processo de caracterização físico-químico do nanomaterial objeto de interesse, deve-se proceder a sua caracterização biológica para avaliação inicial de eventuais repercussões toxicológicas advindas as suas propriedades físico-químicas. Na norma ISO/TR 16197 (2014a) encontram-se relacionados os principais métodos de triagem toxicológica aplicáveis a nanomateriais manufaturados – sendo os testes citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo os métodos mais comumente utilizados para avaliação de viabilidade e mecanismos de toxicidade deflagrados por nanomateriais, segundo Lin et al. (2012) e Park et al. (2009). Para definição dos métodos a serem empregados, aspectos como natureza, principais propriedades físico-químicas, finalidade, forma de apresentação do nanomaterial no produto e rota prevista de exposição devem ser considerados. O consolidado dessas informações fornecerá subsídios úteis ao planejamento da avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais.

Por todo o exposto até aqui, pode-se dizer que o processo de caracterização físico-química de nanomateriais é complexo e carece de sistematização. Isso porque, ainda hoje, questões relacionadas à necessidade de padronização e harmonização de protocolos (incluindo-se os de preparo de amostra e dispersão para obtenção de suspensões estáveis), ao estabelecimento de materiais de referência, ao uso de doses irrealisticamente altas para estudos *in vitro* e *in vivo*, à insuficiência e limitação das metodologias disponíveis para determinação de todas as características requeridas e a necessidade de associar diferentes técnicas para avaliação de uma única característica, bem como a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos para caracterização de nanomateriais em matrizes biológicas – permanecem desafiadoras (BOUWMEESTER et al., 2011; DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009; DUSINSKA et al., 2015; FADEEL et al., 2015; LOURO; BORGES; SILVA, 2013; RIVERA GIL et al., 2010). Fato que, inclusive, tem contribuído para produção de resultados conflitantes entre laboratórios a respeito de possíveis efeitos adversos à saúde deflagrados por nanomateriais

específicos (CAI et al., 2020) – reforçando assim a relevância da utilização de métodos normatizados e validados por laboratórios reconhecidamente competentes na sua execução.

Outro aspecto crítico, com frequência pontuado, refere-se à dosimetria no contexto das caracterizações físico-químicas e de avaliação toxicológica de nanomateriais engenheirados, frente ao seu impacto e implicações nas investigações de nanobiointerações (SINGH et al., 2019). Isso porque, uma metodologia sistematizada para dosimetria *in vitro* requer preparo e caracterização cuidadosos dos nanomateriais, que suspensos em meio fisiológico complexo podem flocular, aglomerar, dissolver e interagir com os componentes do meio, de modo amplamente dependente do protocolo de preparação de dispersão, das características da nanopartícula (inclusive quanto a sua solubilidade) e das propriedades do meio (COHEN; DELOID; DEMOKRITOU, 2015; DUSINSKA et al., 2015). Ademais, discussão ainda não encerrada sobre esse tópico, refere-se à adequabilidade da métrica de dose (se massa, número de nanopartículas, área de superfície) a ser adotada, e sua importância no *design* e interpretação de estudos de nanobiointeração *in vitro*, enquanto estratégia para aumento de sua acurácia e reprodutibilidade, bem como de sua comparabilidade a resultados mensurados *in vivo* (COHEN; DELOID; DEMOKRITOU, 2015; RIVERA GIL et al., 2010).

Nesse cenário, variações terminológicas também assumem papel relevante, conforme ponderado por Fadeel et al. (2015), já que pela falta de padronização das métricas, definições diversas acabam sendo empregadas (tais como dose nominal, intracelular, associada à célula, depositada), a depender da relação resposta/dose-efeito a ser caracterizada – o que pode levar a interpretações errôneas, frente a possíveis discrepâncias entre a dose administrada e aquela realmente entregue.

Conforme evidenciado, muito há que se avançar em termos metodológicos para definição e harmonização de protocolos cientificamente embasados, bem como de adequação e/ou de desenvolvimento de metodologias suficientemente validadas que sejam, de fato, aplicáveis a caracterizações físico-químicas mais assertivas, representativas e reprodutíveis dos de materiais em nanoescala avaliados. Contudo, esse é um processo lento e oneroso, dependente de uma ciência, cujo conhecimento ainda se encontra em construção, bem como de iniciativas científicas colaborativas e projetos de financiamento para sua consecução.

É nesse ambiente que a proposição de uma base de dados universal que congregue dados de caracterização e toxicidade de nanomateriais, a partir de modelos preditivos inteligentes, baseados em ferramentas de bioinformática para o estabelecimento de correlação entre as propriedades físico-químicas de nanopartículas e seus efeitos biológicos, a partir de simulações

quantitativas da relação estrutura-atividade, como o método QSAR¹⁶, bem como a adoção de modelos de células 3D como método alternativo à experimentação animal – enquanto estratégias de testes futuros, com repercussões diretas para o *design* da próxima geração de nanomateriais engenheirados, com melhor perfil de segurança e confiabilidade – tem ganhado relevância como meio de viabilizar uma melhor compreensão das interações nanobiológicas e suas repercussões (DUSINSKA et al., 2015; JIA et al., 2020; MAOJO et al., 2012; OVAIS et al., 2020; XIARCHOS et al., 2020) – haja vista o entendimento já estabelecido de que caracterizar as interações nano-celulares constitui etapa crítica no desenvolvimento de uma compreensão fundamental da nanotoxicologia (HUSSAIN et al., 2015).

Para tanto, engajamento em esforços cooperativos de pesquisa em termos de harmonização e padronização de métodos de caracterização, bem como de colaboração entre laboratórios de especialidades distintas (DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009) para resgate da integridade em pesquisa, confiabilidade e reprodutibilidade de resultados deve ser encorajado, inclusive, para que a aceitação técnica e regulatória do conhecimento gerado seja viabilizada a nível global (XIARCHOS et al., 2020),

4.2.3 Avaliação de Segurança Biológica

Chen, Leong, Lynch (2020b) destacam a nanosseguurança como campo complexo, frente à natureza dinâmica dos nanomateriais e sua suscetibilidade às condições ambientais e à disponibilidade de biomoléculas; além de relevante ao contexto regulatório, e fundamental ao desenvolvimento e aplicação de nanomateriais mais seguros, assim como ao avanço de abordagens analíticas.

Sob seu escopo incluem-se aspectos relacionados desde o *design*/síntese mais segura de nanomateriais até a caracterização de seu comportamento e biotransformação em um espectro de biofluidos relevantes à exposição, elucidação de mecanismos de captura e seu impacto sobre o sistema biológico – idealmente sob condições de dosagem, dispersão e exposição realistas (CHEN; LEONG; LYNCH, 2020a; HIGASHISAKA et al., 2017; SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010).

¹⁶ QSAR: *Quantitative structure-activity relationship*. Modelo quantitativo baseado em relações estrutura-atividade que relacionam as propriedades do material investigado com as atividades biológicas deflagradas.

Assim, com o crescente uso de nanomateriais em áreas relacionadas à Nanomedicina, sua segurança, biocompatibilidade e toxicidade tornaram-se objetos de interesse e investigação no âmbito da Nanotoxicologia, enquanto campo interdisciplinar responsável por lidar com a complexidade toxicológica dos nanomateriais (ADABI et al., 2016), fortemente influenciada por suas propriedades físico-químicas e morfológicas únicas, que combinadas às características do meio biológico de exposição, à via de exposição e dose administrada, tempo de contato ou circulação (WU; TANG, 2018) ditarão o grau de interação e suas potenciais repercussões adversas ao organismo. No que tange às propriedades mencionadas, Shvedova et al. (2010) destacam como parâmetros relevantes aos desfechos toxicológicos: tamanho, dose, área de superfície, estrutura cristalina, recobrimento de superfície, além de aspectos como proteína corona (e sua influência na biodistribuição do nanomaterial) e degradabilidade (já que nanomateriais não degradáveis podem se acumular em órgãos ou intracelularmente causando efeitos deletérios, enquanto os biodegradáveis podem gerar respostas imprevisíveis resultantes aos seus produtos de degradação). Complementarmente, Zielinska et al. (2020) acrescentam variações de formato/morfologia e presença de impurezas como parâmetros que interferem na estabilidade do nanomaterial, e por conseguinte na sua dinâmica de biointeração.

Nesse sentido, avaliação pré-clínica baseada em um programa de testes de biocompatibilidade, constituído por testes *in vivo* complementados por testes *in vitro* para comprovação de segurança dos nanomateriais, tem sido a abordagem adotada para avaliação de segurança biológica desses materiais (SOARES et al., 2018). Modelo este inclusive semelhante, àquele já adotado para dispositivos médicos de forma geral, incluindo-se aqueles que contenham nanomateriais, que além de seguirem as disposições constantes na norma ISO 10993-1 (2018a), que propõe uma abordagem sistemática e estruturada para avaliação biológica de dispositivos médicos, também acolhem as diretrizes apresentadas pela norma ISO/TR 10993-22 (2017a), especificamente dedicada a materiais em nanoescala incorporados a dispositivos médicos.

Considerando-se que, em geral, o universo de materiais empregados na manufatura de dispositivos médicos é conhecido, testes podem não ser necessários, sendo possível construir, por meio da revisão de dados pré-clínicos e clínicos relevantes e disponíveis, um plano de avaliação biológica baseado em literatura científica que seja capaz de evidenciar o histórico de segurança de determinada forma física, aplicada a uma finalidade específica de uso – estabelecendo a partir desses dados, relação de equivalência entre os achados de segurança resultantes à revisão de literatura e o dispositivo médico objeto de interesse.

No entanto, para materiais cuja biocompatibilidade não esteja bem estabelecida ou ainda não seja plenamente conhecida, plano de avaliação de segurança biológica baseado na realização de testes torna-se necessário, para que a lacuna de conhecimento sobre sua segurança biológica possa ser suprimida ou minimizada – realidade que pode ser aplicável a Materiais de Uso em Saúde que incorporem nanomateriais, principalmente, se apresentados sob a forma livre e em produtos invasivos, frente a sua possibilidade de liberação e nanobiointeração, e por conseguinte, alto potencial de exposição interna (SCENIHR, 2015). Entendimento também aplicável a Materiais de Uso em Saúde que incorporem nanomateriais a matrizes degradáveis ou que apresentem potencial para geração e liberação de nano-objetos incidentais, ou mesmo a produtos constituídos por nanoestruturas que, por suas características possam interagir e deflagrar respostas teciduais localizadas. Nanomateriais sob formas fixas ou incorporadas a matrizes não degradáveis também devem ter seu potencial de exposição/interação com o meio avaliado, para que eventuais perigos relacionados possam ser identificados e, seus respectivos riscos, estimados.

Essa avaliação abarca os testes de biocompatibilidade previstos pela norma ISO 10993-1 (2018a), descritos quanto as suas nano-especificidades na norma ISO 10993-22 (2017a). De modo geral, eles são delineados a partir de alguns critérios relacionados ao nível de invasividade, anatomia alcançada e tempo de contato do produto com o corpo humano, além de também levar em consideração suas características constitutivas, finalidade a que se destina sua aplicação, bem como possíveis consequências resultantes a falhas do dispositivo e/ou à própria tecnologia a ele aplicada ou envolvida durante o seu desenvolvimento (ABDI, 2011).

Nesses termos, para estabelecer os testes de avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, é necessário classificá-lo quanto ao nível de invasividade e a duração de seu contato no organismo, nos termos do disposto pela norma ISO 10993-1 (2018a), sumariamente, a seguir descrita:

a) Nível de Invasividade

- Não invasivos:

- *Dispositivos Médicos sem contato:* representados por materiais de uso em saúde que não entrem em contato com o organismo (ex. tubos de coleta de sangue);

- *Dispositivos médicos em contato com superfícies:* representados por materiais de uso em saúde que entrem em contato com pele e membranas mucosas íntegras (por exemplo, bandagens de compressão e lentes de contato, respectivamente) ou superfícies comprometidas

ou lesadas por feridas que requeiram o uso de curativos tipo cobertura ou dispositivos de suporte à cicatrização.

- Invasivos:

- *Dispositivos Médicos de comunicação externa:* representados por materiais de uso em saúde que entrem em contato direto ou indireto com a circulação sanguínea, tal como ocorre com os cateteres intravasculares e conjuntos/extensões para administração de soluções, respectivamente; ou que estabeleçam contato com tecidos/ossos/dentina (como grampos de fixação, materiais de preenchimento dentário);

- *Dispositivos Médicos Implantáveis:* representados por materiais de uso em saúde projetados para ser total ou parcialmente introduzidos no corpo humano (a nível de ossos, tecidos ou circulação sanguínea) por meio de intervenção cirúrgica, e que se destinem a permanecer no local após a intervenção por mais de 30 dias (BRASIL, 2011).

b) Duração de contato

- Exposição limitada: quando o contato cumulativo do material de uso em saúde perdura por até 24h;
- Exposição prolongada: quando o contato cumulativo do material de uso em saúde ultrapassa 24 horas, mas não excede 30 dias;
- Exposição de longo-prazo: quando o contato cumulativo do material de uso em saúde excede os 30 dias.

Definidas as classificações do dispositivo com base no seu nível de invasividade e tempo de contato no organismo, torna-se possível avaliar, sob uma perspectiva de risco, a aplicabilidade de cada um dos testes de biocompatibilidade referenciados na norma ISO 10993-1 (2018a), conforme o caso concreto objeto de análise.

Para tanto, com vistas a implementação de uma estratégia de teste que subsidie, com satisfatoriedade, o processo de gerenciamento de riscos biológicos relacionados a materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, algumas considerações fazem-se oportunas:

- a escolha dos testes de biocompatibilidade deve ser balizada pelas condições de exposição ou contato do dispositivo médico com o organismo humano sob condições normais de uso, sem que a natureza física e química do dispositivo médico final seja desconsiderada (ISO, 2018a);

- os testes devem ser realizados no dispositivo médico acabado ou a partir de amostras representativas desse dispositivo (que podem ser constituídas por materiais submetidos ao mesmo processamento requerido para obtenção do produto final, incluindo-se o processo de esterilização, caso aplicável);
- dispositivos médicos que sofram mudanças durante o seu ciclo de vida, tais como aqueles submetidos a processo de degradação/bioabsorção *in situ*, devem ter sua avaliação biológica considerada em todos os diferentes estados assumidos pelo dispositivo (ISO, 2018a);
- para avaliação de características topográficas, morfológicas e físico-químicas de dispositivos médicos, tem-se como referência a norma técnica ISO 10993-19 (2020a), complementada pela norma ISO 10993-18 (2020b), dedicada especificamente à caracterização química dos materiais que constituem os dispositivos médicos;
- toda avaliação de segurança biológica que envolva dispositivos médicos constituídos por nanomateriais deve considerar as propriedades físico-químicas destes. Nesse sentido, o uso das normas técnicas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a) como referências, mostra-se imperativo à identificação das propriedades físico-químicas aplicáveis ao nanomaterial objeto de interesse, e à determinação dos testes biológicos aplicáveis ao caso concreto (dispositivo + nanomaterial empregado), enquanto subsídio ao processo de gerenciamento de riscos biológicos desse produto;
- para dispositivos médicos que contenham nanomateriais em sua constituição, especial atenção deve ser dada à natureza e caracterização do nanomaterial empregado, assim como a sua forma de apresentação no produto final (livre, encapsulado/incorporado, fixo sob a forma de recobrimento) para proposição e execução de um plano de testes que abarque desfechos importantes e relacionados a eventuais riscos conhecidos ou estimados para o produto objeto de interesse. Assim, além dos testes previstos na norma ISO 10993-1 (2018a), outros testes específicos para avaliação dos nanomateriais empregados em dispositivos médicos podem ser necessários, considerando-se sua potencial liberação/desprendimento do dispositivo médico e duração de exposição;
- sempre que possível, os nanomateriais presentes em dispositivos médicos devem ser testados em uma forma representativa do seu estado “pronto para uso”, de modo que sua exposição mimetize as condições de uso e o nível de contato esperados no organismo. Logo, os testes de biocompatibilidade requeridos, incluindo-se os estudos de toxicocinética (previstos pela norma ISO 10993-16 (2017b), complementada no contexto de nanomateriais pela norma ISO/TR 22019 (2019b)) deverão ser realizados

em nanomateriais obtidos a partir do produto acabado e/ou de amostras de componentes representativos do produto acabado (SCENIHR, 2015);

- assim como definido para outras substâncias e materiais, a segurança biológica dos nanomateriais deve ser estabelecida e assegurada ao longo de todo o seu ciclo de vida no produto, considerando-se os cenários de exposição previstos para o dispositivo que os contenha.

Com base nas informações ora apresentadas e com vistas à representação esquemática do sistema de categorização apresentado e sua correlação com os testes de biocompatibilidade previstos na norma ISO 10993-1 (2018a), elaborou-se o

Quadro 7 – Quadro-resumo em versão adaptada àquela exibida na referida norma, no qual todos os testes de biocompatibilidade aplicáveis, a depender da classificação obtida quanto ao nível de invasividade, duração de contato e especificidades do caso concreto, foram identificados.

Quadro 7 – Quadro-Resumo de Desfechos Biológicos passíveis de análise no contexto de Avaliação Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais

Categorias de dispositivos			Desfechos biológicos passíveis de avaliação nos termos da norma ISO 10993-1																		
Contato com o corpo humano	Duração do contato	Caracterização físico-química, morfológica e/ou topográfica – conforme aplicável	Léxias e Extravas.	Citotoxicidade	Sensibilização cutânea	Irritação ou Reatividade intracutânea	Progenidade (material medida e por contaminantes)	Estudo de toxicocinética (ADME)	Toxicidade sistêmica aguda (24h)	Toxicidade sistêmica subaguda (24h a 28 dias)	Toxicidade sistêmica subcrônica (90 dias)	Toxicidade sistêmica crônica (6 a 12 meses)	Toxicidade específica (reprodutiva/desenvolvimental, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, etc)	Imunotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade	Genotoxicidade	Carcinogenicidade	Degradação		
			Dispositivo médico de superfície	Pele íntegra	Limitado	✘	●	●	●												
Prolongado	✘	●			●	●															
Permanente	✘	●			●	●															
Membrana mucosa	Limitado	✘		●	●	●															
	Prolongado	✘		●	●	●			●	●						●					
	Permanente	✘		●	●	●			●	●	●	●				●	●				
Superfície comprometida ou lesada	Limitado	✘		●	●	●	●		●												
	Prolongado	✘		●	●	●	●		●	●					▲	●					●
	Permanente	✘		●	●	●	●		▲	●	●	●	●		▲	●		●	●	●	●
Dispositivo médico de comunicação externa	Contato indireto com a circulação sanguínea	Limitado	✘	●	●	●	●		●							●					
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●				▲		●			●	
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	●	●
	Contato com tecido/osso/dentina	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●				▲	●		●			●
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●		▲	●		●	●	●	●
	Circulação sanguínea	Limitado	✘	●	●	●	●		●								●	●			
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●			▲	▲	●	●	●	●	●	●
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	▲	▲	●	●	●	●	●	●
Dispositivo médico implantável	Tecidos/Ossos	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●			▲	▲	●		●		●	
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	▲	▲	●		●	●	●	●
	Sangue	Limitado	✘	●	●	●	●		●							●	●	●			
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●			▲	▲	●	●	●	●	●	●
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	▲	▲	●	●	●	●	●	●

Legenda:

- ✘ Pré-requisito necessário a uma avaliação de risco no âmbito da norma técnica ISO 10993-1:2018.
- Testes previstos na norma ISO 10993-1 aplicáveis a dispositivos médicos, de modo geral – passíveis ou não de condução conforme caso concreto.
- ▲ Testes a considerar, especialmente, no contexto de dispositivo médico que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, ou que gerem e liberem nano-objetos.
- ▲ Testes a considerar, conforme achados do estudo de toxicocinética.

Fonte: Adaptado de ISO (2018a).

Por se tratarem de testes gerais e, portanto, não específicos à avaliação de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, algumas observações fazem-se oportunas:

1. Caracterização físico-química, morfológica e/ou topográfica

Apresenta-se como etapa crítica e primordial ao delineamento do plano de avaliação de segurança biológica de qualquer dispositivo médico, mas principalmente, daqueles constituídos por nanomateriais, ao viabilizar a identificação de eventuais perigos por meio da condução de testes específicos, nem sempre considerados no contexto de análise de dispositivos médicos convencionais.

2. Lixiviáveis

A avaliação de risco de lixiviação de substâncias químicas presentes em dispositivos médicos encontra-se disposta na norma ISO 10993-17 (2002). Nessa norma, a exposição estimada precisa ser comparada com as informações de toxicidade. A metodologia para avaliação de limites aceitáveis para essas substâncias também pode ser aplicada aos nanomateriais (SCENIHR, 2015).

3. Citotoxicidade

É descrito como teste *in vitro* baseado em técnicas de cultura celular para determinação de toxicidade celular evidenciada por desfechos como morte, inibição do crescimento celular, formação de colônias e outros efeitos celulares causados por materiais contidos em dispositivos médicos ou em seus extratos (AFSSAPS, 2011) – que tem na norma ISO 10993-5 (2009) suas principais diretrizes.

Embora os métodos previstos na referida norma sejam válidos para avaliação de dispositivos constituídos por materiais convencionais, esses podem e têm sido aplicados àqueles que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais (ISO, 2017a).

Atualmente, tem-se disponível a norma ISO 19007 (2018b), voltada especificamente à avaliação de citotoxicidade de nanomateriais a partir do ensaio MTS *in vitro*¹⁷ – que avalia a viabilidade celular, e cujo escopo pode vir a complementar a abordagem de análise implementada na área de dispositivos médicos de base nanotecnológica. Cumpre pontuar que o método descrito na referida norma constituir-se-ia como uma primeira etapa de mensuração dos efeitos provocados por nanopartículas em sistemas celulares individuais, sendo ele baseado

¹⁷ MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximeoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazólio.

em três protocolos de estudo (identificados como IANH, NanoGo e EMPA-NIST¹⁸), conforme disposto no texto da norma (ISO, 2018b).

Segundo disposição constante no documento AFSSAPS (2011) a citotoxicidade de nanomateriais seria condicionada por dois fatores: a) pela capacidade de internalização do nanomaterial pelas células (que convencionalmente ocorre por endocitose) e b) pela capacidade do nanomaterial de desencadear citotoxicidade (por estresse oxidativo, apoptose, etc.).

Posto isso, mecanismos de citotoxicidade relacionados à captura e internalização de nano-objetos no interior das células seriam deflagrados por sua interação com os componentes biológicos nelas contidos através de diferentes mecanismos de dano direto à membrana celular, ao DNA, assim como relacionados à disfunção mitocondrial, à disfunção lisossomal, à ruptura do citoesqueleto de actina, e provocados pela liberação de íons metálicos (SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018), com consequente comprometimento de suas funções, sendo sua localização determinada por suas propriedades físico-químicas, tamanho e dose (ISO, 2017).

Outro mecanismo importante de toxicidade celular desencadeado por nanomateriais é o estresse oxidativo (que não requer que o nano-objeto, necessariamente, penetre a célula) (SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018; SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010) – resultante à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente ativação de vias de sinalização sensíveis aos potenciais *redox*, condição que, em última análise, culminaria na produção de citocinas e quimiocinas envolvidas em respostas pró-inflamatórias (ISO, 2017a) – que num cenário de mensuração *in vitro* seriam utilizadas como marcadores para determinação desse desfecho (PARK et al., 2009).

Cumprir pontuar que a citotoxicidade de nano-objetos pode ser seletiva a depender da sensibilidade da célula ao agente tóxico, da presença de receptores específicos, ou dos mecanismos de captura celular. Portanto, quando da avaliação de citotoxicidade do nanomaterial empregado, especial atenção deve ser dada à escolha do teste *in vitro*, bem como à relevância do modelo de cultura celular e aos parâmetros específicos do nano-objeto (ISO, 2017a). Outros fatores aventados e que têm sido, inclusive, relacionados ao dissenso observado nos resultados reportados na literatura, relacionam-se às variações nos métodos experimentais (STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009), nas linhagens celulares selecionadas, bem como nos próprios nanomateriais utilizados (AFSSAPS, 2011) – realidade que reforça a premente

¹⁸ IANH: *The International Alliance for NanoEHS Harmonization* (Aliança Internacional para Harmonização NanoESH) – instituída com o objetivo de desenvolver protocolos de teste que avaliassem com precisão a toxicidade e as interações biológicas de nanopartículas em sistemas celulares, cujos resultados fossem reprodutíveis em qualquer laboratório (ISO, 2018b).

necessidade de adesão a protocolos validados (ou as suas versões modificadas, quando aplicável), bem como adoção de controles relevantes (STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009) para obtenção de resultados mais confiáveis e reprodutíveis.

Aspecto relevante a ser considerado sobre os efeitos citotóxicos, relaciona-se ao fato de esses diferirem a depender do tamanho, forma, composição química e propriedades de superfície dos nanomateriais, podendo seus resultados também serem impactados pelo tempo de exposição – o que requer interpretação cautelosa para esse tipo de teste, já que quanto maior a exposição, maior pode ser o efeito citotóxico desencadeado (AFSSAPS, 2011).

Outro elemento de destaque a ser ponderado na avaliação desse desfecho relaciona-se às possíveis interferências causadas pelos nanomateriais nos testes de citotoxicidade *in vitro*, especialmente aquelas causadas por agentes fluorescentes e colorimétricos usados nesse tipo de avaliação, sendo nesses casos, necessário empregar diferentes metodologias para interpretação cientificamente válida (AFSSAPS, 2011). Corroboram essa perspectiva o disposto por Stone; Johnston; Schins (2009), que apontam como melhor maneira de minimizar falhas de interpretação, a combinação de pelo menos dois ensaios de citotoxicidade diferentes, que avaliem desfechos diferentes e que, portanto, apresentem resultados sob óticas diferentes. Ademais, segundo Park et al. (2009) existe a possibilidade de os nanomateriais afetarem desfechos citotóxicos distintos, assim como de haver incompatibilidade de certos ensaios com os nanomateriais ou tipos celulares utilizados.

4. Sensibilização

Os testes de sensibilização previstos na norma ISO 10993-10 (2010a) podem ser utilizados para estimar o potencial de sensibilização por contato deflagrado por dispositivos médicos, materiais e/ou seus extratos – já que o contato ou a exposição repetida, mesmo a pequenas quantidades de potenciais lixiviáveis, podem resultar em sensibilização e no desencadeamento de reações alérgicas (ISO, 2018a).

No que tange à capacidade de nanomateriais desencadarem uma reação de hipersensibilidade pós-exposição, essa depende primeiro e, principalmente, de sua habilidade em atravessar barreiras como a pele, por exemplo, e interagir com proteínas. Já que é a partir do complexo nano-objeto/proteína, que o sistema imunológico reconhece o nano-objeto – evento esse fundamental ao processo de sensibilização (AFSSAPS, 2011).

Conforme disposto pela norma ISO 10993-22, apesar de nano-objetos e nanomateriais poderem resultar em sensibilização, seu potencial para deflagrar esse tipo de reação é

relativamente desconhecido. Quanto às nanopartículas, a literatura disponível atualmente descreve, principalmente, sua falta de capacidade de sensibilização (ISO, 2017a).

Por outro lado, alguns cientistas acreditam que, a toxicidade observada na presença de nanopartículas seja resultante a sua solubilização em meio biológico ou nas células, sendo os íons derivados desse processo mais tóxicos que as nanopartículas das quais se originaram (AFSSAPS, 2011).

Especificamente no que tange aos vários ensaios descritos na norma ISO 10993-10 (2010a), tais como o teste de Buehler (BT), teste de maximização em porquinhos-da-índia (GPMT), ensaio de linfonodo local (LLNA), teste de *patch* em humanos (HPT) e teste GPMT modificado (com aplicação em superfície) – usados para avaliação de dispositivos médicos e também de nanopartículas, tem-se que os testes de sensibilização BT, LLNA, HTP e GPMT modificado podem não ser efetivos para muitos dos nanomateriais, devido a função de barreira da pele. Logo, células-alvo e órgãos para sensibilização, células dendríticas na pele e linfonodos de drenagem poderiam não ser alcançados pelos nano-objetos (ISO, 2017a).

Em assim sendo, um resultado negativo não pode ser interpretado com base na suposta ausência de propriedades sensibilizantes dos nanomateriais analisados, já que ele pode ser consequência da incapacidade dos nano-objetos de penetrarem a superfície dérmica – o que torna seu valor menos expressivo. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para explorar essa questão, que se confirmada, poderá requerer o desenvolvimento de novos ensaios de sensibilização específicos para nanomateriais (ISO, 2017a). Portanto, com base no conhecimento atual, não é possível contar com o uso de um método de teste específico para análise de sensibilização cutânea provocada por nanomateriais (SCENIHR, 2015).

Nesse cenário, o teste GPMT é, atualmente, o mais relevante para detecção de possível atividade de sensibilização resultante à exposição a nanomateriais, por se basear em aplicação intradérmica, embora a fase de indução intradérmica seja seguida por uma fase de indução tópica e desafio tópico em pele íntegra (SCENIHR, 2015).

Cumprе ressaltar que, os testes supramencionados identificam apenas o risco de hipersensibilidade tardia. Para hipersensibilidade aguda mediada por imunoglobulina-E, atualmente, não há ensaios disponíveis (SCENIHR, 2015).

5. Irritação ou Reatividade Intracutânea

Previstos pela norma ISO 10993-23 (2021), os testes de irritação e de reatividade intracutânea destinados à avaliação de dispositivos médicos, são também aplicáveis a nanomateriais (ISO, 2017a).

Os testes de irritação (dérmica ou mucosa) podem ser usados para estimar o potencial de irritação de nanomateriais contidos em dispositivos médicos aplicados a estruturas como pele, olhos e mucosas – íntegras ou lesadas. Contudo, em relação ao uso dos métodos de irritação mucosa para avaliação de nano-objetos, pouca informação encontra-se disponível na literatura (ISO, 2017a).

A respeito dessas abordagens, faz-se oportuno considerar que a maioria dos dados publicados sugere que a pele intacta é uma boa barreira contra a penetração de nano-objetos e que a penetração dérmica além das camadas epidérmicas não ocorreria. No entanto, no que tange a folículos pilosos, glândulas sudoríparas e superfícies dérmicas comprometidas devido a ferimentos mecânicos, afecções dermatológicas (dermatite, psoríase), patológicas (infecção, inflamação) e foto dano (queimadura por exposição solar) – esses estariam mais suscetíveis à captura de nanomateriais pela pele (ISO, 2017a), devendo a possibilidade de sua ocorrência ser considerada, estimada e avaliada quanto aos potenciais riscos relacionados a sua exposição nesses cenários.

Por oportuno, conforme disposto pela norma ISO/TR 10993-22, várias propriedades poderiam afetar a captação de nano-objetos após sua exposição à pele, olhos ou mucosa, dentre as quais citam-se: tamanho, formato, área de superfície, carga de superfície, atividade/energia de superfície, solubilidade, estado de agregação, polidispersividade e cinética de dissolução dos íons (ISO, 2017a).

Quanto ao teste de reatividade intradérmica, esse se destina à avaliação de reação localizada em tecido exposto ao nanomaterial sendo, portanto, aplicável a dispositivos médicos implantáveis ou que tenham contato com o sangue, já que para esses casos a determinação de irritação dérmica por testes dérmicos ou de mucosa mostrar-se-ia inapropriada (ISO, 2017a; ISO, 2018a). Isso porque, a introdução intracutânea de nano-objetos ultrapassa o extrato córneo, condição que pode resultar em um maior potencial de irritação pelo alcance dos fibroblastos. Cumpre pontuar que, esse tipo de teste também pode ser útil para avaliação de nanomateriais hidrofóbicos. (ISO, 2018a; ISO, 2017a). Para outras rotas clínicas de exposição, a irritação pode ser avaliada pela aplicação tópica de nanomateriais (ISO, 2017a) que resulta, em geral, na ocorrência de irritação leve a moderada (AFSSAPS, 2011).

Logo, a escolha entre os métodos de teste, hoje disponíveis, precisa ser racionalizada com base nas condições específicas de uso e rotas de exposição dos materiais e dispositivos objeto de análise (ISO, 2017a).

6. *Pirogenicidade*

Os testes de pirogenicidade fazem parte do processo de avaliação biológica e têm como finalidade detectar reações pirogênicas mediadas por material ou contaminantes, a partir de extratos de dispositivos médicos ou materiais (ISO, 2018a).

Atualmente, nenhum teste diferencia reações pirogênicas material mediadas daquelas resultantes à contaminação por endotoxinas. A pirogenicidade material mediada é rara, tendo sido observada em dispositivos médicos que contêm derivados biológicos (ISO, 2018a).

Como quaisquer outras superfícies de materiais, os nanomateriais podem ser recobertos por endotoxinas bacterianas ou lipopolissacarídeos (LPS) – descritas como moléculas encontradas na membrana externa de bactérias *gram* negativas, constituindo-se assim como contaminantes biológicos ativos comuns, que no contexto de avaliação dos nanomateriais, têm ganhado relevância, não apenas por sua adsorção facilitada a eles (relacionada à natureza altamente reativa de sua superfície, e também à capacidade de ligação dos próprios lipopolissacarídeos a qualquer tipo de superfície/material), mas principalmente, por seus efeitos biológicos deletérios (de potente atividade inflamatória e efeitos tóxicos/inflamatórios) mediados pela via de sinalização TLR4 – ou seja, por receptores *Toll-Like 4*, expressos por diversas células do sistema imunológico inato (tais como as células dendríticas e macrófagos, bastante sensíveis e responsivas ao estímulo por endotoxinas) que podem mascarar ou induzir interpretações equivocadas quanto à real toxicidade e/ou efeitos biológicos, de fato, deflagrados pelo nanomaterial avaliado (HIMLY et al., 2020; LI; BORASCHI, 2016; LI; FUJITA; BORASCHI, 2017). Nesse cenário, as endotoxinas têm sido identificadas como um contaminante comum de nanomateriais (JONES; GRAINGER, 2009)(ISO, 2017a).

Associando-se as características das endotoxinas ao tamanho reduzido e à relação volume por área de superfície dos nanomateriais, estes estariam sujeitos à ligação de grandes quantidades de endotoxinas a sua superfície. Por isso, a contaminação de nanomateriais por endotoxinas deve ser considerada quando se discutem efeitos imunológicos, especialmente, por ser esse um evento frequente e, em geral, relacionado às condições de manipulação durante o processo de síntese do nanomaterial ou pelo uso de reagentes /vidraria contaminados (JONES; GRAINGER, 2009).

Por isso, cautela na interpretação dos resultados obtidos na avaliação de efeitos tóxicos/inflamatórios apresentados por nanomateriais torna-se imperativa, haja vista que a presença de endotoxina na amostra avaliada pode responder pela maioria dos efeitos observados ou atuar sinergicamente com o nanomaterial na indução de ativação celular e toxicidade (GREISH; THIAGARAJAN; GHANDEHARI, 2012; LI; BORASCHI, 2016) – pois devido a sua interação com os sistemas biológicos, as endotoxinas podem interferir nos resultados dos testes de avaliação biológica, e assim, levar a conclusões incorretas a respeito da biocompatibilidade dos nanomateriais (ISO, 2017a).

Situação contornável pela prática de caracterização completa para contaminantes biologicamente ativos em nanomateriais sob teste (LI; BORASCHI, 2016), o que inclusive conferiria maior confiabilidade aos dados nanotoxicológicos obtidos *a posteriori* – mas a ser ideal e peremptoriamente superada pela adoção de boas práticas laboratoriais e de fabricação.

Outro aspecto a ser considerado na detecção de endotoxina em amostras de nanomateriais é o possível efeito de mascaramento ocasionado pela baixa recuperação de endotoxina, potencialmente relacionada à presença de substâncias quelantes, surfactantes e detergentes em formulações utilizadas para estabilização dos nanomateriais (HIMLY et al., 2020).

No que tange aos métodos de detecção de endotoxinas, Li, Fujita, Boraschi (2017) ressaltam a importância de se considerar a confiabilidade e relevância do método de ensaio utilizado para essa finalidade. Para o contexto de análise de nanomateriais engenheirados, o ensaio de lisado de amebócito *Limulus* (LAL)¹⁹ tem sido o mais recomendado por sua rapidez, sensibilidade e especificidade, apesar de sujeito a interferências de leitura provocadas pelo próprio nanomaterial – condição que reforça a necessidade de validação do método e adoção de controles adequados (LI; BORASCHI, 2016; LI; FUJITA; BORASCHI, 2017; STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009), bem como adoção de pelo menos duas metodologias de LAL com diferentes desfechos/leituras para avaliação de endotoxina em nanomateriais (DOBROVOLSKAIA et al, 2010).

A norma ISO 29701 (2010b) descreve o teste LAL como método para determinação de endotoxina em amostras de nanomateriais dispersas em meio aquoso (ISO, 2017a). Vale ressaltar que essa norma é restrita a amostras teste para sistemas *in vitro*, podendo-se adaptar os métodos para nano-objetos a serem administrados em animais por vias parenterais.

¹⁹ Original: *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL).

Outro método disponível, é o teste de ativação de monócitos (*MAT*)²⁰, método quantitativo e validado que explora o mecanismo natural de febre humana, e que pode ser usado para testar endotoxinas associadas a nanomateriais, assim como outros pirógenos biológicos (tais como leveduras, parasitas, vírus) (DOBROVOLSKAIA, M.A., et al, 2014; HARTUNG, T., & SABBIONI, E., 2011). Por não distinguir entre os efeitos induzidos por endotoxinas e outros pirógenos, o teste de *MAT* não seria recomendado como teste de primeira escolha, sendo assim realizado em paralelo ao ensaio de *LAL*, para detecção de outros possíveis agentes pirogênicos, além das endotoxinas (LI; FUJITA; BORASCHI, 2017).

Faz-se oportuno considerar que os ensaios tradicionais de quantificação para endotoxinas podem não funcionar de forma confiável para nanomateriais, porque suas propriedades podem interferir com os reagentes e/ou métodos de detecção utilizados nesses ensaios (DOBROVOLSKAIA, M.A., et al, 2010; NEUN, B.W., & DOBROVOLSKAIA, M.A., 2011).

Em assim sendo, Himly et al (2020) dispõem sobre algumas recomendações para atestar que um nanomaterial está livre de endotoxinas, quais sejam: a) testar o nanomaterial por pelo menos dois métodos diferentes, ou seja, baseados em princípios diferentes, b) esses métodos devem ser validados e incluir controles adequados e, c) os resultados obtidos devem ser reproduzidos pelo menos duas vezes com amostras preparadas independentemente. Segundo Schwarz et al (2014), os níveis de endotoxina devem ser inferiores a 0.02 ng mL^{-1} , i.e., $<0.1 \text{ EU mL}^{-1}$, nas doses de nanomateriais que serão avaliadas, por esse quantitativo já ser capaz de estimular células imunológicas.

Logo, compreender e controlar essa interface é um desafio chave à compreensão da biocompatibilidade do nanomaterial, avaliação de risco e possíveis mecanismos de toxicidade (JONES; GRAINGER, 2009).

7. Estudos de Toxicocinética

O processo decisório para realização ou não de estudos toxicocinéticos como parte da avaliação biológica de um dispositivo médico, deve levar em consideração o produto acabado e seus constituintes químicos, incluindo-se produtos de degradação e lixiviáveis potenciais e projetados, bem como o uso pretendido do dispositivo médico (ISO, 2018a).

Estudos dessa natureza fornecem informações sobre o destino e o comportamento das substâncias em avaliação, bem como sobre órgãos-alvo potencialmente atingidos e

²⁰ Original: *Monocyte Activation Test* (*MAT*).

toxicologicamente afetados. Tem-se que as propriedades toxicocinéticas de nanomateriais, bem como de outras substâncias, envolvem quatro processos fundamentais à avaliação de segurança, quais sejam: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) – já que esses podem ser alterados pela natureza do nanomaterial e por suas interações biológica (SCENIHR, 2015). Por serem processos difíceis de prever, estudos de toxicocinética tornam-se imprescindíveis à avaliação dos efeitos de biodistribuição-acumulação-retenção-excreção de nanopartículas, fornecendo assim informações necessárias à predição e compreensão dos potenciais efeitos toxicológicos dessas nanopartículas nos órgãos-alvo, conhecimento fundamental à condução dos demais estudos de toxicidade (LIN et al., 2012; WU; TANG, 2018).

Dentre as condições a serem consideradas para realização de estudos toxicocinéticos devem ser ponderados: se o dispositivo médico é absorvível, se foi projetado para contato de longo prazo, se apresenta corrosão significativa ou degradação conhecida ou provável, se o dispositivo médico libera quantidades substanciais de produtos de degradação reativos ou potencialmente tóxicos e lixiviáveis no corpo durante seu uso clínico; se quantidades substanciais de nano-objetos são liberadas do dispositivo (ISO, 2018a).

Considerando-se que, em dispositivos médicos os nanomateriais podem estar presentes como materiais livres, fixos ou incorporados, tendo cada um seu potencial para liberação de nano-objetos no corpo – o maior risco aventado para essa realidade relaciona-se à presença ou liberação de nano-objetos livres, íons ou componentes que constituam os nanomateriais individuais, conforme asseverado pela norma ISO/TR 10993-22 (2017a). Entendimento corroborado pelo documento AFSSAPS (2011), que considera a existência do risco de toxicidade e translocação relacionado a nanomateriais livres, embora esse seja um risco apenas parcialmente conhecido.

Conforme disposição constante nesse mesmo documento, os estudos de toxicocinética devem ser considerados para dispositivos médicos que contenham nanomateriais que entrem em contato direto com o corpo humano, com especial ênfase aos dispositivos implantáveis. Sendo ressaltada a ideia de que, esses estudos seriam ainda mais essenciais para dispositivos médicos contendo nanomateriais livres e que apresentem produtos de degradação em nanoescala (AFSSAPS, 2011) – condição ou possibilidade a ser aventada já no plano de avaliação de segurança biológica sob uma perspectiva de risco.

Fatores como via de administração, tamanho do nano-objeto ou seus agregados/aglomerados, propriedades de superfície (carga e química de superfície), adsorção de proteínas (diretamente relacionada ao reconhecimento do nanomaterial pelo sistema imunológico e sua captura pelo sistema retículo endotelial, bem como pela mudança gradual de

seu perfil biológico ao longo de sua exposição na circulação), solubilidade (LANDSIEDEL et al., 2012), hidrofobicidade, estado de dispersão, funcionalização (LOURO; BORGES; SILVA, 2013), espécie animal, dose e métodos de dosagem têm, todos, sido considerados influenciadores da toxicocinética de nanomateriais em modelos animais (ISO, 2017a). No contexto de sistemas de teste, o ambiente circundante (meio de cultura de tecido, sangue/sérum, presença de proteína) é apontado como elemento determinante à ocorrência de interações que possam afetar as características e mesmo, comportamento dos nanomateriais com conseqüente impacto no seu perfil toxicológico (ISO, 2017a), fato que sinaliza para a importância da mimetização do ambiente a que o nanomaterial será exposto no organismo, tanto em termos de porta de entrada como rota de exposição (LIN et al., 2012).

Portanto, caso a avaliação de risco conclua pela necessidade de realização do estudo de toxicocinética, fatores que possam influenciar o *design* do estudo, sua *performance* e a interpretação de seus resultados deverão ser endereçados (ISO, 2017a), com vistas a minimização de eventuais distorções que possam comprometer a adequada compreensão da análise em curso. Ademais, quando apropriado, processos de degradação teóricos devem ser investigados previamente aos estudos toxicocinéticos (ISO, 2018a).

Por oportuno, cumpre considerar que modelos [toxicocinéticos] fisiologicamente baseados podem figurar como uma opção à avaliação desse tipo de desfecho, conforme asseverado por Landsiedel et al. (2012). Contudo, conforme ponderado pelos mesmos autores, um complicador adicional a essa abordagem residiria na ausência de sistema linfático, importante sistema orgânico de acumulação de nanomateriais, especialmente, daqueles administrados por via endovenosa (LANDSIEDEL et al., 2012).

8. Toxicidade Sistêmica

Por poderem alcançar a corrente sanguínea, estudos de toxicidade *in vivo*, enquanto modelos biológicos complexos, podem se fazer necessários na avaliação de comportamento e destino de nanomateriais circulantes no organismo, inclusive por permitirem avaliações de toxicidade aguda, de toxicidade de longo prazo, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, efeito de irritação local e toxicocinética (LIN et al., 2012).

Em assim sendo, especificamente no que tange à avaliação de toxicidade sistêmica, essa compreende os testes de toxicidade aguda (24h), subaguda (de 24h a 28 dias), subcrônica (90 dias) e crônica (geralmente de 6-12 meses, quando considerados roedores) para diversas rotas de exposição (AFSSAPS, 2011), que segundo asseverado por Wu; Tang (2018) constituem

parte crítica na avaliação de toxicidade de nanopartículas, por poderem afetar diferentes sistemas e causar diferentes efeitos adversos, resultantes aos mecanismos de toxicidade comumente deflagrados pela exposição a nanomateriais, quais sejam: estresse oxidativo resultante à produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e resposta inflamatória.

Por poderem se distribuir, potencialmente, por todo o corpo, a seleção de tecidos/órgãos a serem submetidos à análise histopatológica deve ser realizada caso a caso, com especial ênfase ao sistema retículo-endotelial, também conhecido como sistema fagocítico mononuclear que, notadamente, inclui fígado e baço (enquanto órgãos mais afetados pela captura de nanomateriais), além de rins, cérebro, medula óssea e outros, a depender também da rota de administração e uso clínico pretendido (AFSSAPS, 2011; ISO, 2017a).

Por isso, os estudos de toxicidade sistêmica para dispositivos médicos contendo nanomateriais devem ser o mais completo possível, o que implica a avaliação de parâmetros clínicos, biológicos e anatomopatológicos.

Um parâmetro chave a considerar na avaliação do potencial de toxicidade sistêmica de nanomateriais é seu perfil de solubilidade, já que nanomateriais pouco solúveis podem sobrecarregar a capacidade de eliminação e os mecanismos de defesa do organismo, e assim, levar à acumulação sistêmica de longo prazo, e por conseguinte a efeitos adversos (ISO, 2017a). Contudo, apesar de sua relevância, dados de exposição crônica de nanomaterial ainda são escassos (JONES; GRAINGER, 2009).

Conforme disposição constante na norma ISO/TR 10993-22 (2017a), bem como no documento AFSSAPS (2011), a biopersistência de nanomateriais insolúveis pode levar a mudanças na permeabilidade lisossomal, atividade enzimática e apoptose de macrófagos.

Outro aspecto importante a se considerar, refere-se à dose administrada. A métrica de dose baseada em massa ou concentração, usualmente, aplicada a materiais *in bulk* pode não ser adequada para nanomateriais cuja toxicidade sistêmica dependerá, especialmente, da interação entre a própria partícula e o sistema biológico. Logo, o número de partículas administradas e/ou a área de superfície resultante podem ser parâmetros mais assertivos à descrição da relação dose-resposta observada (ISO, 2017a).

9. Toxicidade Reprodutibilidade/Desenvolvimento

Referenciados na norma ISO 10993-3 (2014b), os testes de toxicidade reprodutiva são utilizados para avaliar os potenciais efeitos de dispositivos médicos, materiais e/ou de seus

extraíveis na função reprodutiva, no desenvolvimento embrionário (teratogenicidade), bem como no desenvolvimento pré e pós-natal imediato.

Assim como a carcinogenicidade, esses desfechos podem ser endereçados por meio de uma avaliação de risco baseada em literatura (ISO, 2018a). Quando evidência adequada e suficiente demonstra que um nanomaterial ou seus metabólitos não alcançam os órgãos do sistema reprodutivo, testes de toxicidade reprodutiva não são necessários. Em geral, ela pode ser estabelecida a partir de dados provenientes de estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ISO, 2017a; SCENIHR, 2015).

Por outro lado, avaliação por meio de testes costuma ser considerada apenas se o dispositivo médico apresentar impacto sobre o potencial reprodutivo do indivíduo (devido a sua exposição prolongada ou permanente ao produto ou pela presença de nanopartículas ou lixiviáveis de nanomateriais, cuja eliminação completa não tenha sido demonstrada – por exemplo), não tendo seus eventuais riscos sido plenamente gerenciáveis. Nesse caso, a avaliação de toxicidade reprodutiva dos nanomateriais empregados nesse dispositivo deverá ser realizada em conformidade com os requisitos da norma ISO 10993-3 (ISO, 2018a; ISO, 2017a).

O conhecimento atual relacionado à toxicidade reprodutiva dos nanomateriais permanece escasso e limitado (ISO, 2017a). Contudo, por serem capazes de atravessar barreiras biológicas, acredita-se que as nanopartículas sejam também capazes de perpassarem as barreiras do sistema reprodutivo com potencial impacto na vitalidade e função dos espermatozoides, assim como no desenvolvimento embrionário (ISO, 2017a), podendo, por sua alta mobilidade, difundirem-se nos órgãos reprodutivos. Danos ao material genético por meio de interações com moléculas de DNA também podem deflagrar mutações e afetar a reprodução e o desenvolvimento de próximas gerações (AFSSAPS, 2011; ISO, 2017a).

Por oportuno, segundo disposição constante na norma ISO/TR 10993-22 (2017a), a diretriz OCDE 421 também pode ser útil para obtenção de informações iniciais sobre possíveis efeitos adversos provocados por nanomateriais, enquanto teste de triagem. Podendo seus resultados serem utilizados como subsídio a uma avaliação inicial de perigos, tornando-se úteis ao processo de tomada de decisão quanto à necessidade ou não de testes adicionais para avaliação de desfechos relacionados à toxicidade reprodutiva prevista na norma ISO 10993-3.

10. Imunotoxicidade

Dispostos na norma ISO/TS 10993-20 (2006), os testes de imunotoxicidade devem ser considerados com base na natureza química dos materiais e dados que sejam sugestivos de

efeitos imunotoxicológicos ou frente ao desconhecido potencial imunogênico de algumas substâncias químicas (ISO, 2018a).

Em geral, a imunotoxicidade é avaliada durante o teste de toxicidade de dose repetida (28 ou 90 dias) durante a qual as primeiras indicações para imunossupressão e/ou imunoestimulação podem ser detectadas. Para dispositivos médicos, as investigações de imunotoxicidade tipicamente envolvem estudos de implantação prolongados (ISO, 2017a).

De acordo com a norma ISO/TR 10993-22 (2017a), a maioria dos nanomateriais estudados, até o momento, são nano-objetos que ao entrarem na circulação sistêmica acabam capturados pelas células do sistema fagocitário mononuclear (macrófagos, células dendríticas ou células de *Langerhans*), motivo pelo qual precisam ter seu potencial imunotóxico avaliado.

Nesse sentido, a interação entre nanomateriais engenheirados e o sistema imune tem se tornado alvo de crescente interesse, frente à capacidade desses nanomateriais de ativarem o sistema complemento e induzirem danos mediados por esse sistema (BORASCHI; CASTELLANO; ITALIANI, 2017). E isso porque, o sistema imunológico é o responsável por ditar as consequências patológicas e toxicológicas pós-exposição a nanomateriais engenheirados, por meio de dois mecanismos de imunomodulação:

- a ativação de resposta imunológica (conhecida como imunoestimulação) – por interação direta dos nanomateriais com células imunológicas efetoras (como macrófagos e mastócitos) e ativação do sistema complemento (componente humoral da imunidade inata), ou pelo desencadeamento de resposta inflamatória pela interação de nanomateriais engenheirados e sua biocorona com a superfície de células imunológicas (via imunidade inata – de caráter defensivo e autolimitado) ou por interação com células apresentadoras de antígenos (via imunidade adaptativa e seus mecanismos de deflagração de reações de hipersensibilidade) (ALSALEH; BROWN, 2018; CRONIN et al., 2020; FARRERA; FADEEL, 2015) ou;
- a supressão dessa resposta (Imunossupressão) – por meio de diferentes mecanismos, não plenamente elucidados (ALSALEH; BROWN, 2018).

Segundo Boraschi et al (2020), a resposta imunológica deflagrada pela exposição a nanomateriais é influenciada por fatores diversos, tais como o tipo de nanomaterial, rota, dose, duração da exposição, condições de saúde do indivíduo. Destaque à biocorona, enquanto componente importante na determinação do potencial imunogênico dos nanomateriais, bem como ponderação à influência de variações sutis nas propriedades físico-químicas de nanomateriais (mesmo aquelas observadas lote a lote) na modulação de respostas do complemento, também foram realizados por Alsaleh & Brown (2020) – estando esses

parâmetros, diretamente, relacionados ao processo de endocitose pelas células imunes e sua ativação (AFSSAPS, 2011) e, por conseguinte, à própria natureza e extensão da resposta imune.

Sob essa perspectiva, os referidos autores consideram que os estudos de nano-imunossegurança voltados à imunidade inata devam ser priorizados em relação aos estudos de imunidade adaptativa, por ser aquela mais precoce e comum entre os organismos vivos, além de gerar um tipo de reação imune mais potente quando em contato com materiais estranhos.

Por outro lado, Alsaleh & Brown (2020) destacam a importância da resposta imunológica adaptativa, no contexto das reações de hipersensibilidade alérgicas do tipo I (imediatas e mediadas por IgE) deflagradas pela exposição do organismo a diferentes nanomateriais engenheirados.

Ademais, vertentes de pesquisa voltadas à avaliação da imunotoxicidade de nanopartículas produzidas de forma “furtiva” para que passem “despercebidas” pelo sistema imune, e aquelas que miram componentes celulares e que, portanto, podem interferir com esse sistema (AFSSAPS, 2011) tornaram-se objeto de crescente interesse nos últimos anos. Isso porque, pelo *design* de nanopartículas “furtivas”, seria possível alcançar maior compatibilidade com o sistema imune, o que teria repercussão direta sobre a efetividade terapêutica da aplicação pretendida.

Tais considerações reforçam a importância de rigorosa caracterização da identidade sintética, mas principalmente, biológica de nanomateriais engenheirados no contexto de aplicações biomédicas, frente ao seu papel determinante na imunomodulação e imunotoxicidade do nanomaterial avaliado (ALSALEH; BROWN, 2018; FARRERA; FADEEL, 2015) – corroborando, inclusive, para a discussão e amadurecimento do conceito “*safer-by-design*” à luz da imunosssegurança, pela projeção de nanomateriais de toxicidade reduzida, mas dotados de propriedades úteis ao alcance da finalidade desejada (FARRERA; FADEEL, 2015; HJORTH; VAN HOVE; WICKSON, 2017).

Uma outra perspectiva relevante, destacada por Boraschi et al (2020), aponta para a necessidade de repensar aspectos importantes relacionados à validade e capacidade de predição dos estudos de imunosssegurança realizados, no que tange à adoção de condições experimentais pouco representativas e, por conseguinte, não extrapoláveis a situações *in vivo* (tal como o emprego de altas concentrações de nanomateriais), à incapacidade de reprodução de respostas imunológicas complexas, próprias de organismos vivos, por meio de experimentos *in vitro* (inclusive e, principalmente, em cenários de exposição crônica) e às limitações inerentes às diferenças interespecies e o comprometimento das extrapolações de resultados propostas, em contextos de experimentação *in vivo*.

Surge daí a necessidade de identificação e desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* mais assertivos, que possam representar realisticamente as reações imunológicas *in vivo* deflagradas por nanomateriais e, assim evidenciar seu verdadeiro risco à saúde, em termos de uso/aplicação e exposição (e também, de organismo, rota, tecido/órgão-alvo, condições de saúde e tempo de exposição) (BORASCHI et al., 2020; HJORTH; VAN HOVE; WICKSON, 2017). Nesse contexto, os modelos e abordagens alternativas para dedução mecanística das implicações biológicas resultantes à exposição a nanomateriais, com destaque ao desenvolvimento de sistemas multicelulares constituídos por populações de células imunológicas relevantes à avaliação das diferentes vias de sinalização utilizadas pela resposta imunológica inata desencadeada por nanomateriais engenheirados têm ganhado espaço (CRONIN et al., 2020; HJORTH; VAN HOVE; WICKSON, 2017; ISO, 2017a).

Logo, sendo a avaliação de imunotoxicidade essencial ao uso seguro de nanomaterias, o desenvolvimento de testes *in vitro* e de modelos celulares para avaliação desse desfecho torna-se fundamental, frente à robustez de modelos experimentais *in vivo*, que ainda teriam como vantagem [apesar das discussões relacionadas ao princípio dos 3Rs²¹ – no sentido de reduzir, refinar e substituir o uso de animais em experimentos] a viabilidade de avaliação de fatores como adsorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), críticos à avaliação da resposta imunológica deflagrada por nanomateriais (DUSINSKA et al., 2017).

Contudo, por envolver uma grande diversidade de células, moléculas e mecanismos por meio de suas respostas inespecíficas (imunidade inata) e específicas (imunidade adaptativa), é importante selecionar modelos celulares realistas e avançados, condição que também requer análises complexas e estratégias sofisticadas. Para esse cenário, modelos *in silico* do tipo QSAR, baseados em vias de resultados adversos, associados a abordagens de agrupamento, em estratégias integradas para avaliação de toxicidade (conhecidas como IATA²²), bem como testes iterativos baseados em sucessivos processos de *redesign* e reanálise de potenciais riscos – são tidos como perspectivas futuras promissoras e relevantes ao avanço dos estudos de nanosseguurança (HIMLY et al., 2020; HJORTH; VAN HOVE; WICKSON, 2017).

11. Implantação

²¹ 3Rs: Replacement, Reduction and Refinement.

²² IATA: *Integrated Approaches to Toxicity Assessment* (HIMLY et al., 2020).

Testes de implantação, previstos na norma ISO 10993-6 (2016), podem ser utilizados para avaliar os efeitos patológicos locais em tecido vivo provocados por uma amostra de material ou produto acabado cirurgicamente implantado, a níveis macro e microscópico.

Até a presente data, não há métodos específicos validados ou aceitos para avaliação biológica de nanomateriais implantáveis (SCENIHR, 2015), apesar de orientações poderem ser tomadas como referência na referida norma. Contudo, conforme disposto na norma ISO/TR 10993-22 (2017a), para nano-objetos livres, injeção direta dentro do tecido em que o dispositivo seria implantado deve ser considerada.

Especial atenção também deve ser dada à migração de nano-objetos para os linfonodos de drenagem local, considerando-se a ocorrência de sua possível liberação/desprendimento do dispositivo médico implantado (ISO, 2017a; SCENIHR, 2015).

12. Hemocompatibilidade

A avaliação de hemocompatibilidade inclui cinco parâmetros, nos termos do disposto pela norma ISO 10993-4 (2017b), quais sejam: hematologia, trombose, coagulação, plaquetas e sistema complemento, sendo, portanto, aplicável a dispositivos médicos que entrem em contato com a circulação sanguínea, de modo geral.

Isso porque, qualquer superfície artificial, quando em contato com a circulação sanguínea, seria capaz de deflagrar reações de defesa não-específicas no sangue, afetando elementos celulares (células polinucleadas, células vermelhas, plaquetas), proteínas plasmáticas (sistema complemento) e mediadores químicos. Condição que leva, dentre outras repercussões, a efeitos de coagulação, resultantes à ativação plaquetária e à produção de trombina – fenômenos sinérgicos que podem levar à ocorrência de trombose, sinal de ausência de hemocompatibilidade (AFSSAPS, 2011).

Em assim sendo, a avaliação de hemocompatibilidade torna-se imperativa para materiais nanoestruturados, dispositivos que contenham nanomateriais ou que liberem nano-objetos que entrem em contato direto ou indireto [frente a sua potencial capacidade de translocação e alcance da circulação sanguínea, evidenciadas por estudo toxicocinético] com o sistema circulatório, haja vista a adsorção de proteínas séricas a sua superfície e o desencadeamento de uma cascata de eventos que podem resultar em sucesso ou falha desse dispositivo (ISO, 2017a).

Conforme descrito pelo documento da Agência Reguladora Francesa, dois seriam os principais mecanismos envolvidos nesse processo, aquele relacionado ao espessamento sanguíneo, bloqueio dos vasos, danificação das paredes dos vasos ou deflagração de resposta

inflamatória localizada – com redução do fluxo sanguíneo [provocado pela interação direta do nanomaterial/nano-objeto com o sangue]; ou desencadeado por mediadores químicos inflamatórios na corrente sanguínea e ativação de reações inflamatórias localizadas nos vasos dos órgãos afetados, como resposta indireta à presença de nanomateriais na circulação sanguínea (AFSSAPS, 2011).

Cumpra pontuar que, apesar de as metodologias descritas na norma ISO 10993-4 poderem ser aplicadas à avaliação de superfícies nanoestruturas, o mesmo não necessariamente ocorre com a análise de nano-objetos livres, que por sua maior relação superfície/volume e potencial de agregação/aglomeração distorcem a cascata de reações resultantes a sua presença na circulação, tornando o processo de análise ainda mais desafiador (ISO, 2017a) e necessário.

Ademais, a depender das características do nano-objeto desprendido do produto e liberado na circulação (tais como geometria, área de superfície, propriedades e química de superfície) (SCENIHR, 2015; ISO, 2017a), diferentes respostas poderão ser deflagradas, levando a resultados de hemocompatibilidade variáveis. Tamanho e rugosidade de superfície exercem importante papel na extensão da adsorção de proteínas séricas, adesão e ativação plaquetária, bem como em toda a cinética de coagulação sanguínea (ISO, 2017a).

Por todo o disposto, é imprescindível que a reprodutibilidade, confiabilidade e sensibilidade dos métodos utilizados sejam atestadas, antes que qualquer conclusão sobre a hemocompatibilidade de nano-objetos livres seja cancelada (ISO, 2017a).

Especificamente no que tange ao sistema complemento, esse faz interface com os sistemas circulatório e imunológico (resposta inata), motivo pelo qual aumentos anormais na ativação desse sistema por materiais em nanoescala presentes no sangue podem induzir reações inflamatórias significativas. Por isso, teste de ativação do complemento deve ser incluído como parte da avaliação de risco biológico de nanomateriais, especialmente se eles entrarem em contato direto com o sangue circulante ou se houver potencial migração de nanopartículas livres para o sistema circulatório (ISO, 2017a).

13. Genotoxicidade

A norma ISO 10993-3 (2014b) é aplicável à avaliação de dispositivos médicos ou de seus componentes cujo potencial para os desfechos de genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva e desenvolvimental seja desconhecido ou tenha sido identificado (ISO, 2017a).

Especificamente no que tange à avaliação de genotoxicidade, essa é tida como crucial à avaliação de segurança de novos compostos e produtos, incluindo-se os nanomateriais, frente

ao seu potencial de causar danos ao DNA, e a possível relação desses danos com a ocorrência de mutações e carcinogênese (DUSINSKA et al., 2017; KARLSSON et al., 2014; SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018; SCENIHR, 2015). No contexto de dispositivos médicos, materiais e/ou seus extratos [incluindo-se aqueles que contenham nanomateriais], os testes de genotoxicidade são, geralmente, utilizados para avaliar o potencial de mutações genéticas, mudanças na estrutura e número de cromossomos, e outras toxicidades genéticas ou ao DNA provocadas por eles (ISO, 2018a).

Dentre os mecanismos mais prováveis de indução de genotoxicidade, destaca-se a via do estresse oxidativo (primário indireto ou secundário, por resposta inflamatória) (DUSINSKA et al., 2017). Especificamente, no que tange aos mecanismos de genotoxicidade deflagrados por nanomateriais, esses são, essencialmente, divididos entre:

- Primários: resultantes a danos genéticos causados pelo contato direto do nanomaterial com o DNA e/ou componentes a ele relacionados – o que se dá por difusão ou transporte ativo do nanomaterial através da membrana celular com conseqüente alcance do núcleo, podendo também ocorrer no momento da divisão celular, quando o envelope nuclear desaparece, e o nanomaterial acumulado no interior da célula interage diretamente com DNA e proteínas nucleares causando efeitos primários diretos (AFSSAPS, 2011). Nesse mesmo ambiente, os nano-objetos podem desencadear danos indiretos por: a) produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em resposta à interação de estruturas celulares com nanomateriais – induzindo lesões ao DNA ou afetando/interrompendo a separação cromossômica durante a mitose (potencial aneugênico), com conseqüente perturbação do processo de divisão celular e desorganização do tráfego celular (ISO, 2017a; AFSSAPS, 2011); b) pela depleção de antioxidantes endógenos (DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010; MAGDOLENOVA et al., 2014) – que pelo desequilíbrio redox desencadearia o fenômeno de estresse oxidativo, seguido de uma resposta inflamatória e apoptose celular anormal); ou c) pela inibição de reparo do DNA, com potencial para causar resultados carcinogênicos (ISO, 2017a; AFSSAPS, 2011).
- Secundários: em que os danos genéticos são resultantes ao processo inflamatório deflagrado por células de defesa e inflamatórias recrutadas e envolvidas nos processos de endocitose e fagocitose do nanomaterial exposto (AFSSAPS, 2011; DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010; MAGDOLENOVA et al., 2014).

No que tange às propriedades físico-químicas relacionadas ao desencadeamento de processos genotóxicos, Donaldson; Poland; Schin (2010) e Magdolenova et al. (2014) destacaram a composição, o tamanho diminuto, a ampla área de superfície dos nanomateriais,

suas propriedades de superfície, solubilidade, assim como a constituição de agregados, frente à possibilidade de liberação de partículas de menor peso molecular. Realidade que reforça a importância de uma caracterização completa e bem reportada, realizada sob condições ambientais de exposição previstas (devido a sua influência sobre a cinética, distribuição e interação do nanomaterial com os componentes biológicos), inclusive no que se refere à escolha de controles adequados e à definição da dosagem a ser avaliada (que deve ser plausível e realista), para adequada interpretação de resultados frente a eventual efeito genotóxico observado (DOAK et al., 2009; DONNER et al., 2010; DUSINSKA et al., 2017; GREIM; NORPPA, 2010; MAGDOLENOVA et al., 2014). Isso porque o emprego de altas doses possuiria potencial confundidor, por causar efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios não relacionados ao nanomaterial em si (DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010), contribuindo para obtenção de resultados genotóxicos falso-positivos, comumente observados em testes *in vitro*.

Outros potenciais confundidores vinculados às investigações de nanogenotoxicidade, com potencial repercussão sobre a análise e interpretação de resultados errôneos, foram também levantados por Doak et al. (2009), e são eles: a) as interações de nanomateriais com corantes fluorométricos e colorimétricos levando a resultados de falsa absorvância, b) a interação de nanomateriais com os meios de cultura utilizados e a formação de proteína corona de diferentes características, conforme configuração ambiental de exposição, c) os procedimentos dos ensaios de genotoxicidade convencionais (que podem requerer adequações quanto à ordem de suas etapas, ao tempo de exposição do nanomaterial para obtenção de resultados mais fidedignos), d) a ocorrência de aglomeração (por reduzir a captura celular, levar à sedimentação e, assim provocar exposição diferenciada do nanomaterial a culturas celulares em suspensão ou aderentes). Logo, consciência e atenção a esses aspectos podem melhorar a qualidade dos ensaios de genotoxicidade *in vitro*, tornando o conjunto de dados por eles gerados mais confiável e reprodutível.

Consideração também importante realizada por Dusinska et al. (2017), relaciona-se à importância de se identificar e estudar a degradação de nanomateriais em ambiente biológico, que vai ao encontro de preocupação expressamente manifesta pela norma ISO 10993-22 relacionada ao comportamento reativo de nano-objetos metálicos, e seu consequente potencial genotóxico e carcinogênico (ISO, 2017a).

Quanto aos testes disponíveis para avaliação de genotoxicidade, cumpre pontuar que nenhum deles é capaz de detectar, por si só, os diferentes mecanismos de indução de danos genéticos desencadeados por substâncias químicas tais como lesões ao DNA, mutagenicidade

a nível gênico, quebra ou rearranjo cromossômico ou aberração cromossômica numérica, motivo pelo qual abordagem do tipo bateria de testes, sensível a diferentes tipos de danos genéticos, tem sido adotada como a melhor alternativa para detecção de perigos genotóxicos (DUSINSKA et al., 2017; KARLSSON et al., 2014; MAGDOLENOVA et al., 2014; SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018; STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009; ISO, 2014b; ISO, 2015b) , sendo essa comumente aplicada à avaliação de dispositivos médicos e materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais.

Essa é uma estratégia que comporta métodos de teste *in vitro* e *in vivo*, sendo os últimos defendidos como necessários à validação de dados obtidos pelos primeiros (GREISH; THIAGARAJAN; GHANDEHARI, 2012) ou para elucidação de resultados divergentes obtidos por testes *in vitro* – enquanto abordagem do tipo “peso de evidência”. Logo, a menos que se possa demonstrar adequadamente que achados positivos *in vitro* não são relevantes para a situação *in vivo* ou que seja impossível testar o nanomaterial *in vitro*, testes *in vivo* serão necessários (SCENIHR, 2015) – pelo menos até que métodos alternativos ao uso de animais sejam validados e aceitos para fins regulatórios.

No que se refere aos testes de genotoxicidade, a norma ISO/TR 10993-33 (2015b) referencia seis testes comumente recomendados para avaliação do potencial genotóxico de dispositivos médicos, pela maioria das autoridades regulatórias, e baseados nas diretrizes de teste da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE):

- Teste de mutação bacteriana reversa (OCDE 471) – tecnicamente modificado para dispositivos médicos;
- Teste *in vitro* de aberração cromossômica realizada em cultura de células de mamíferos (OCDE 473) – tecnicamente modificado para dispositivos médicos;
- Teste *in vitro* de micronúcleo realizado em cultivo de células de mamíferos (OCDE 487) – tecnicamente modificado para dispositivos médicos;
- Teste *in vitro* de mutação gênica usando células de linfoma de rato, realizado em cultura de células de mamíferos (OCDE 476) – tecnicamente modificado para dispositivos médicos;
- Teste *in vivo* de micronúcleo em eritrócitos de mamíferos (OCDE 474);
- Teste *in vivo* de aberração cromossômica (OCDE 475).

Quanto à aplicabilidade dos testes *in vitro* ao contexto de nanomateriais, tem-se que:

O teste de mutação bacteriana reversa (Teste de Ames – OCDE 471), considerado como teste de triagem confiável para análise de substâncias químicas, não seria apropriado à avaliação de mutação pela própria estrutura celular das bactérias, cuja parede funcionaria como barreira

à difusão de nanomateriais (especialmente sob formas aglomeradas), bem como por sua inviabilidade de realizar endocitose – condições que em conjunto reduziriam, substancialmente, a captação de nanomateriais e sua exposição ao DNA, produzindo assim resultados falso-negativos (SCCS, 2012; SCENIHR, 2015; STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009).

Portanto, para avaliação da genotoxicidade de nano-objetos, recomenda-se a utilização de sistemas constituídos por células de mamíferos, devido ao seu potencial para captura de nano-objetos – o que se justifica pelo fato de todos os testes *in vitro* precisarem demonstrar o processo de captura celular como indicativo de potencial exposição do DNA ao nanomaterial sob investigação (SCENIHR 2015).

Assim, as melhores opções para avaliação *in vitro* do potencial genotóxico de nanomateriais presentes em dispositivos médicos, nos termos do disposto pelo documento SCENIHR (2015) e pela norma ISO/TR 10993-22 (2017a), seriam:

- Teste *in vitro* de mutação gênica em cultura de células de mamíferos (OCDE 476), para avaliação da indução de mutações genéticas em células de mamíferos, pela detecção de mutações genéticas e danos cromossômicos (formação de grandes e pequenas colônias);
- Teste *in vitro* de micronúcleo realizado em cultura de células de mamíferos (OCDE 487), por detectar danos citogenéticos em conjunto com um ensaio de mutação genética ou ensaio de linfoma de rato para detecção de alterações sequenciais de menor escala (mutações pontuais) ou com o teste de aberração cromossômica (OCDE 473), sendo o último mencionado apenas no documento SCENIHR (2015). Segundo asseverado por Karlsson et al. (2014) e Magdolenova et al. (2014), o teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese que detecta a quebra de cromossomo (clastogenicidade), assim como os efeitos de aneuploidia (alteração cromossômica numérica) devido a distúrbios físicos do aparato mitótico – seria o segundo método de ensaio *in vitro* mais empregado na avaliação de genotoxicidade;
- Teste do cometa *in vitro* (teste de eletroforese de célula única em gel) para detecção de vários tipos de danos ao DNA a depender das condições do ensaio. Apesar de esse ser o teste mais comumente utilizado em nanotoxicologia (em sua versão alcalina), sua leitura pode ser comprometida por possíveis interações com o nanomaterial, tal como aquela observada pela presença ocasional de nanopartículas na “cabeça do cometa”, condição que implicaria em contato direto entre o nanomaterial e o DNA desnudo durante o processamento do ensaio, o que teria potencial para induzir quebras adicionais ao DNA, e por conseguinte, levar a resultados com níveis de danos falsamente elevados,

frente a sua alta sensibilidade (KARLSSON et al., 2014; MAGDOLENOVA et al., 2014).

Caso haja circunstâncias sob as quais desvios aos ensaios acima listados sejam possíveis, justificativa científica deve ser fornecida e considerações adicionais ou estudos *in vivo* poderão ser necessários (SCENIHR 2015).

Quanto aos testes de genotoxicidade *in vivo*, sua escolha deve ser definida por especialistas, que com base em todas as informações disponíveis, definirão o melhor teste a ser aplicado conforme o caso (SCENIHR, 2015). Isso porque, métodos apropriados devem ser usados para estabelecer que, de fato, o nano-objeto testado alcança o órgão-alvo (ISO, 2017a), e se esse persiste nas células, tendo em vista que seu acúmulo pode levar a efeitos tóxicos de longo prazo – motivo pelo qual essa é uma informação fundamental na avaliação de risco (PARK et al., 2009). Outro aspecto importante a ser considerado, conjuntamente à demonstração de exposição do órgão-alvo, é a rota de exposição na população pretendida – sendo os estudos de toxicocinética de grande valia nesse processo.

Nesse sentido, estudos de toxicidade subaguda e/ou subcrônica também podem ser usados para determinar a distribuição de nano-objetos no organismo, informação que pode ser útil à seleção de um teste de genotoxicidade que assegure que o órgão testado é relevante à avaliação de distribuição e acumulação dos nano-objetos (ISO, 2017a).

Portanto, os testes de genotoxicidade *in vivo* devem relacionar o(s) desfecho(s) genotóxico(s) identificado(s) como positivo(s) na abordagem *in vitro* com os órgãos ou tecidos-alvo apropriados. A evidência, tanto do próprio teste como de outros estudos toxicocinéticos ou toxicológicos de dose repetida, de que os tecidos-alvo foram expostos à substância em estudo e/ou aos seus metabólitos é essencial para a interpretação de resultados negativos (SCENIHR 2015).

Dentre os testes de genotoxicidade *in vivo* comumente utilizados para avaliação de nanomateriais, segundo o documento SCENIHR (2015) e a norma ISO/TR 10993-22 (2017a), citam-se:

- Teste de micronúcleo *in vivo*, realizado em eritrócito de roedor ou medula óssea (OCDE 474);
- Teste de aberração cromossômica *in vivo*, realizado na medula óssea de mamíferos (OCDE 475);
- Teste do cometa *in vivo* (OCDE 489).

O teste de aberração cromossômica espermatogonial de mamíferos (OCDE 483) e a análise de mutação genética em roedores transgênicos (OCDE 488) também foram

considerados, mas apenas pelo documento SCENIHR (2015), que sinaliza para a necessária avaliação de adequabilidade de todos os métodos supramencionados (desenvolvidos para análise de químicos) à avaliação de nanomateriais, frente às suas propriedades físico-químicas distintas, que podem seriamente influenciar sua interação com o DNA.

Frente a todo o exposto, e considerando a diversidade de desfechos e testes disponíveis para avaliação de genotoxicidade, Doak & Pfuhler (2009) enfatizam a necessidade de avaliação quanto à adequabilidade desses testes para análise do potencial genotóxico dos nanomateriais, bem como de seu desempenho no contexto da nanogenotoxicidade, para que os testes mais apropriados à detecção de perigos genotóxicos induzidos por nanomateriais sejam adotados. Nesse contexto, recomendações relacionadas à inclusão de controle positivo relevante, bem como de utilização de doses em concentrações fisiologicamente relevantes, inclusive em relação à avaliação de citotoxicidade, escolha do tipo celular, com base na via de exposição e potencial órgão-alvo de preocupação merecem ser reforçadas (STONE; JOHNSTON; SCHINS, 2009).

Sobre os métodos de teste *in vitro* e *in vivo* disponíveis, cabe ressaltar suas especificidades quanto aos mecanismos de genotoxicidade investigados, haja vista que os primeiros, tais como os testes do Cometa e de Micronúcleo seriam sensíveis à identificação de mecanismos primários, deflagrados por nanopartículas intrinsecamente reativas; enquanto os modelos de teste *in vivo* teriam capacidade única de avaliar respostas inflamatórias sustentadas (DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010; MAGDOLENOVA et al., 2014), por basearem-se em sistemas vivos complexos capazes de evidenciar, de forma consistente e precisa, respostas celulares deflagradas por diferentes sistemas do organismo em condições fisiológicas (DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010; GREISH; THIAGARAJAN; GHANDEHARI, 2012; MAGDOLENOVA et al., 2014).

Outro aspecto importante, e que ainda hoje permanece atual, refere-se ao elevado e crescente número de novos nanomateriais disponíveis e em desenvolvimento, e a inviabilidade técnica de avaliações genotóxicas caso a caso, corroborando assim a necessidade de avanço na compreensão da natureza e propriedades físico-químicas dos nanomateriais (DONALDSON; POLAND; SCHINS, 2010), inclusive, pela integração de novas tecnologias ao processo de avaliação de risco biológico, tal como os modelos *in vitro* alternativos do tipo “*omics*” e *in silico* baseados em modelagem matemática, enquanto ferramentas para elucidação de vias mecanísticas envolvidas nas respostas toxicológicas desencadeadas por nanomateriais (CATALÁN; NORPPA, 2017; GREISH; THIAGARAJAN; GHANDEHARI, 2012), para que sua futura predição se torne viável.

Nesse cenário, uma outra abordagem considerada por Catalán, Stockmann-Juvala, Norppa (2017) e que pode ganhar espaço, é aquela baseada no peso de evidência das informações disponíveis nos estudos realizados, avaliadas quanto a sua qualidade (em termos metodológicos, inclusive quanto à confiabilidade do teste realizado, e de conteúdo, considerando-se a completude das informações apresentadas, inclusive no que tange aos dados de caracterização do nanomaterial) a partir de critérios estabelecidos com base no conhecimento corrente – com vistas à extrapolação sistematizada dos achados alcançados quanto ao potencial mutagênico de determinado nanomaterial a nanoformas de características semelhantes. Contudo, essa é uma estratégia que requer volume e qualidade de dados, em certa medida, para que se torne viável e assertiva ao propósito requerido, assim como útil à avaliação de perigos relacionados a nanomateriais similares, e potencialmente aplicável a outros desfechos toxicológicos de interesse.

14. Carcinogenicidade

A norma ISO 10993-3 (2014b) discute a estratégia para avaliação de carcinogenicidade de dispositivos médicos, materiais e/ou de seus extraíveis ao longo de um período substancial do tempo de vida útil do animal submetido ao teste. Nos termos do disposto pela norma ISO 10993-1 (2018a), a carcinogenicidade pode ser endereçada pela avaliação de risco – a partir de informações relacionadas à identificação química das impurezas, extraíveis ou substâncias químicas lixiviáveis, à exposição do paciente a essas substâncias, ao seu modo de ação e ao peso de evidência.

Se disponível, a informação sobre carcinogenicidade deve ser adequada para a rota e duração de exposição ou contato, devendo essa informação estar disponível na literatura de toxicidade.

Nesse sentido, os resultados de estudos de genotoxicidade podem ser úteis para predição da carcinogenicidade de nanomateriais (ISO, 2017a), já que para materiais genotóxicos, o perigo carcinogênico pode ser presumido e o risco devidamente gerenciado (ISO, 2014b). Logo, caso a realização de teste de carcinogenicidade seja, de fato, necessária sua determinação e adequabilidade à amostra teste deve ser avaliada caso a caso. Para nano-objetos, por exemplo, sua conformidade não foi demonstrada (ISO, 2017a).

15. Degradação

Informações relacionadas à degradação devem ser fornecidas para quaisquer dispositivos médicos, componentes ou materiais que permaneçam dentro do tecido e que

tenham potencial para sofrer alterações no corpo humano. Tal afirmação, aplica-se inclusive ao contexto de nanomateriais, já que esses podem ser detectados em pacientes utilizando dispositivos médicos, sob a forma de produtos resultantes a processos de degradação, desgaste, atrito, abrasão, polimento, corrosão; ou como impurezas e resíduos de manufatura, conforme asseverado pelo documento AFSSAPS (2011).

Nesse sentido, os testes de degradação devem ser considerados para dispositivos projetados para serem absorvidos, cujo uso pretendido tenha duração superior a 30 dias (incluindo-se nesse escopo, os dispositivos implantáveis) ou cuja composição indique que produtos de degradação tóxicos possam ser liberados durante seu contato com o organismo (ISO, 2018a; ISO, 2017a; ISO, 2017c).

A norma de referência que versa sobre a identificação e quantificação de potenciais produtos de degradação provenientes de dispositivos médicos, sob uma perspectiva geral, é a ISO 10993-9 (2019c), que tem seu conteúdo complementado por outras normas mais específicas, quais sejam: ISO 10993-13, ISO 10993-14 e ISO 10993-15 que abarcam aspectos de degradação material-específico relacionados a polímeros, cerâmicas e ligas metálicas, respectivamente.

Especificamente no que tange aos materiais metálicos, faz-se oportuno ponderar que, em conjunção à liberação de íons, a ocorrência de corrosão também pode resultar na liberação de partículas em nanoescala. Para certos nanomateriais, é sabido que novos nano-objetos podem ser formados a partir de íons liberados (como por exemplo, a nano-prata) (VAN DER ZANDE et al., 2012).

Por todo o exposto até aqui e segundo asseverado por Saifi, Khan e Goduku (2018), o exato mecanismo de toxicidade de nanopartículas é ainda desconhecido, apesar de haver consenso sobre a multitude de fatores que a deflagram (tais como as diversas propriedades nano-específicas e a presença de impurezas resultantes aos processos de síntese e manufatura de nanopartículas) e contribuem para sua manifestação (liberação de espécies reativa de oxigênio, de citocinas pró-inflamatórias, comprometimento da fagocitose, aumento da permeabilidade das barreiras, fibrose, alteração da regulação do ciclo celular e de dano ao DNA). Por outro lado, permanece o dissenso sobre riscos intrínsecos, perigos, toxicidade ou relação dose-reposta para quase todas as classes de nanomateriais, conforme pontuado por Jones & Grainger (2009).

Por isso, uma estratégia de teste que envolva diferentes desfechos de toxicidade, e que se utilize de métodos e modelos alternativos capazes de mimetizar as condições *in vivo* constituem o grande desafio e expectativa ao avanço na avaliação de segurança e, por conseguinte, de risco à saúde humana pela exposição a nanomateriais (DUSINSKA et al., 2017).

Nesse sentido, considerações adicionais a respeito dos métodos de avaliação de biocompatibilidade, realizadas por Hu et al. (2017), evidenciam, com maior especificidade, a magnitude dos desafios a serem enfrentados e superados pelos estudos de nanosseguurança, no que tange a: a) necessidade de adoção de sistemas biológicos que mimetizem a estrutura 3D e o ambiente celular; b) a falta de procedimentos confiáveis para análises quantitativas e qualitativas de derivados de nanomateriais *in situ*; c) o preparo cuidadoso necessário à preservação das propriedades químicas e biológicas do nanomaterial objeto de interesse; d) a falta de protocolos padronizados para avaliação de segurança biológica, o que dificulta a comparabilidade entre os resultados de estudos (conduzidos sob condições experimentais distintas, a partir de modelos animais ou linhagens celulares diversas e expostos a amostras de nanomateriais de propriedades díspares); e sua extrapolação ou associação de um determinado perfil toxicológico a um certo tipo de nanomaterial (LOURO; BORGES; SILVA, 2013); e) a necessidade de avaliação do nanomaterial biotransformado e seu ciclo de vida; f) a necessária consideração de nano formas incidentais (resultantes ao processo de produção) como potencial risco a ser identificado, avaliado e controlado; g) a importância das abordagens de triagem de alto rendimento na condução de ensaios e geração de dados *in silico* e *in vitro*, e mesmo *in vivo* para classificação de risco; e sua integração com a categorização/agrupamento nanomateriais como estratégia eficaz ao *design* de nanomateriais biocompatíveis.

Outra lacuna importante a ser endereçada pelas pesquisas em nanosseguurança relaciona-se à necessária associação entre a acumulação tecidual de nanopartículas no organismo no longo prazo e seu potencial para desencadear doenças, com vistas ao desenvolvimento de nanomateriais e produtos de base nanotecnológica mais seguros, sustentáveis e melhor regulados, sob uma perspectiva de gerenciamento de risco (HIGASHISAKA et al., 2017) – o que hoje, apenas seria possível sob condições de exposição reais. Contexto que comportaria, segundo Greish, Thiagarajan e Ghandehari (2012) e Saifi, Khan e Godugu (2018), testes de toxicidade *in vivo* (do tipo subagudo, subcrônico e crônico, bem como de toxicocinética) capazes de reproduzir com precisão, eventuais efeitos tóxicos em sistema vivo complexo.

Em meio a esse contexto de desafios técnicos, não se pode também desconsiderar as adversidades regulatórias, representadas, de modo geral, pela ausência de diretrizes específicas

relacionadas à avaliação de toxicidade de nanopartículas, motivo pelo qual diferentes autoridades têm se esforçado para produzir orientações apropriadas ao uso seguro desses materiais (SAIFI; KHAN; GODUGU, 2018) – utilizando-se para isso, do conhecimento em progressão disponível e das normas técnicas de referência existentes, para delinear o perfil de análise de risco biológico a ser conduzido (baseado na condução abrangente e sistemática de ensaios de caracterização e de testes toxicológicos/de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*), bem como para pautarem padrões de revisão mais criteriosos, apesar das muitas limitações metodológicas e procedimentais existentes e ainda não superadas – por ser esta a única alternativa possível num cenário tecnológico permeado por incertezas como o da Nanotecnologia.

4.2.4 Avaliação de Riscos, Perigos e Tomada de Decisão

Conforme asseverado por Hristozov et al (2012), a avaliação de risco é um procedimento que combina princípios regulatórios e científicos de forma sistemática para descrever o perigo associado à exposição do organismo ou ambiente a substâncias químicas [inclusive incorporadas a produtos que, nesse contexto devem ter seu ciclo de vida considerado]. Para tanto, avaliação dos dados disponíveis e de informações relacionadas às características intrínsecas da substância e de seus efeitos toxicológicos, associados aos dados de exposição (em termos de rota, frequência e duração) devem ser considerados na avaliação de perigos biológicos.

Sob uma perspectiva mais específica, Linkov, Satterstrom, Corey (2008) dispõem que, uma avaliação de risco adequada e que suporte o desenvolvimento bem sucedido de dispositivos nanomédicos requer uma compreensão toxicológica e de potenciais efeitos adversos associados ao nanomaterial candidato para a aplicação biomédica desejada, assim como do próprio ciclo de vida do produto – o que necessariamente implica na condução de estudos de caracterização e toxicológicos/de biocompatibilidade do nanomaterial objeto de interesse e do dispositivo final no qual será empregado, conforme explicitado nos capítulos anteriores.

Contudo, essa ainda é uma questão em aberto, já que a avaliação de potenciais risco e perigos relacionados às propriedades diferenciadas dos nanomateriais é incompleta ou mesmo ausente – por se tratar de uma tarefa cara, lenta e complicada, geralmente, alcançada pela combinação de experimentos *in vitro* e *in vivo*, para estimativa dos perigos humanos e

ambientais, e que dificilmente estabelece conclusões claras quanto aos perigos impostos pelos nanomateriais, devido às limitações relacionadas à ausência de princípios internacionais padronizados para avaliação de seus potenciais riscos, o que acaba por comprometer a interpretação dos resultados experimentais – influenciados pelos tipos de procedimentos e protocolos aplicados, bem como pelo restrito número de nanomateriais, doses e momentos de análise avaliados (AFANTITIS et al., 2020; HWANG et al., 2012).

Corroborando essa análise, o disposto por Canady (2010) e Oomen et al. (2014) sobre fontes de incerteza em nanotoxicologia com repercussão direta sobre a avaliação de risco de nanomateriais, ainda hoje comprometida pela: falta de padronização metodológica (especialmente quanto à métrica de dosagem) e seu impacto na avaliação do tipo peso de evidência (baseada em análise comparativa entre estudos de um mesmo nanomaterial); necessidade de métodos analíticos adequados à avaliação de algumas classes de nanomateriais; transformação dinâmica e influência de impurezas sobre a formação da proteína corona, suas propriedades e interações; validade preditiva limitada dos ensaios e modelos animais utilizados; pronunciada falta de dados de caracterização físico-química e, o conseqüente comprometimento da identificação das características físico-químicas relacionadas aos efeitos documentados nos estudos de toxicidade – o que tem dificultado a comparabilidade de resultados, e suscitado a discussão sobre a geração de novos dados experimentais, que se mostrem relevantes à avaliação de exposição e perigo de nanomateriais engenheirados (HRISTOZOV et al., 2012; OOMEN et al., 2014). Ademais, conforme ponderado por Johnston, et al. (2013), Grieger, Hansen; Baun (2009) e Hwang, et al (2012) a falta de dados de perigo e exposição na literatura disponível e a escassez de dados de efeito e exposição, figuram como condições que introduzem alta incerteza ao processo de caracterização de risco de nanomateriais.

Mesmo esse panorama, não desabona a necessidade de uma caracterização ampla e cuidadosa de aspectos morfológicos, físico-químicos e biológicos, a partir de modelos *in vivo* e *in vitro*, não apenas de nanomateriais manufacturados [em versão pristina, original], mas também de nanomateriais expostos a meios relevantes; combinada à avaliação dos efeitos de métodos de dispersão e de interação molecular com componentes biológicos, células e tecidos sobre as propriedades dos nanomateriais – por representarem etapa fundamental ao controle efetivo de riscos, segundo Accomasso, Cristallini, Giachino (2018) – apesar da inadequabilidade de alguns dos métodos atualmente existentes e disponíveis para esse propósito. Entendimento partilhado por Balbus, et al. (2007), que também aponta para a necessidade de desenvolvimento de estudos e métodos de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), com vistas não só à superação de desafios analíticos de detecção de

nanopartículas e seus produtos, mas à obtenção de dados complementares à avaliação de risco. Por fim, Johnston, et al (2013) destaca a necessidade de seleção adequada do nanomaterial objeto de interesse, de identificação de modelos, vias de exposição, sítios-alvos e desfechos toxicológicos de interesse que sejam relevantes, bem como de se desenvolver métodos alternativos ao uso de animais, baseados em sistemas preditivos *in vitro*, frente à crescente diversidade de nanomateriais – como desafios importantes relacionados a sua avaliação de risco.

Outra consideração importante a respeito da avaliação de perigos relacionados a nanomateriais, refere-se à necessidade de integração e avaliação de dados de toxicidade e caracterização de nanomateriais muito díspares e limitados, categorização e agrupamento de nanomateriais, assim como a derivação de rotas de exposição, formas e concentrações e, determinação de níveis limítrofes de perigo para saúde humana (AFANTITIS et al., 2020).

Realidade que, somada ao grande número e variedade de nanomateriais explorados, evidencia a inviabilidade da avaliação de potenciais riscos, a partir de métodos *in vitro* ou *in vivo*, em uma abordagem caso a caso (tal como reconhecida por reguladores e realizada por cientistas); e confere espaço ao avanço de metodologias alternativas e computacionais (modelos *in silico*), enquanto possibilidades úteis à predição de potenciais perigos e à melhoria da eficiência das avaliações nanotoxicológicas, não apenas em termos de tempo e custo, mas a nível de informação, por fornecerem *input* ao *design* de nanomateriais seguros e funcionais (ACCOMASSO; CRISTALLINI; GIACHINO, 2018; AFANTITIS et al., 2020; OOMEN et al., 2014; SOM et al., 2012).

Nesse sentido, o emprego de estratégias alternativas de testes *in vitro* e *in silico*, tais como técnicas de alto rendimento, triagem de alto conteúdo, modelagens computacionais com potencialidade para analisar de modo comparativo diversos nanomateriais, simultaneamente, têm ganhado espaço e destaque por seu potencial de otimizar análises e prover condições de avaliação do produto durante o seu processo de desenvolvimento. Contudo, por seu estágio de desenvolvimento e pelas importantes lacunas de conhecimento ainda existentes, o uso dessas metodologias tem se limitado a processos de triagem e priorização de nanomateriais para testes toxicológicos posteriores, já que ainda carecem de aceitação regulatória (ACCOMASSO; CRISTALLINI; GIACHINO, 2018; FADEEL et al., 2018).

Apesar da escassez de metodologias especificamente desenvolvidas para avaliação de risco sob bases sistemáticas e padronizadas, que oportunizem o desenvolvimento de políticas de gerenciamento de risco compreensivas e aplicáveis a nanomateriais, estudos de análise de risco computacional têm figurado como tópico em ascensão nos últimos anos, tendo esses sido

direcionados à toxicidade de nanomateriais, aos efeitos de longo prazo e acumulação, às relações dose-resposta em contexto de exposição a nanomateriais contidos em produtos de consumo; sendo uma parcela limitada desses estudos focada na avaliação de risco regulatória (ERBIS et al., 2016).

Dentre os modelos de análise de risco atualmente disponíveis, incluem-se aqueles baseados em simulação, árvores de decisão, análise Bayesiana, estrutura de categorização, métodos de tomada de decisão multicritério, modelos farmacocinéticos fisiologicamente baseados, tendo esses sido apontados por Linkov, Satterstrom, Corey (2008) e Hristozov et al. (2012), como abordagens sistemáticas e promissoras na diminuição de incertezas e suporte à tomada de decisões, por meio da combinação de informações heterogêneas e provenientes de fontes dispersas. Entretanto, a ausência de dados nanotoxicológicos qualificados e suficientemente abrangentes tem comprometido o desempenho, aplicabilidade e amadurecimento dos modelos de análise de risco supramencionados como um todo – fato que tem dificultado sua aplicação à tomada de decisão regulatória, ainda hoje, estabelecida sob as bases de uma abordagem do tipo caso a caso (HRISTOZOV et al., 2012).

Abordagem essa já adotada no âmbito de dispositivos médicos, de modo geral, mas que ganha contornos ainda mais específicos e criteriosos quando aplicada a cenários inovadores como o da Nanotecnologia. Já que, na avaliação de risco de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais devem ser considerados tanto seu potencial para interação, liberação e desencadeamento de efeitos tóxicos resultantes à presença/aplicação do nanomaterial a sua estrutura; como seu potencial para geração de nanopartículas como produtos de degradação, desgaste ou processos de tratamento mecânico sofridos pelo produto (JAGIELLO et al., 2017; MITRANO et al., 2015). Ademais, tipo de dispositivo, tipo de tecido e duração do contato também devem ser levados em consideração nesse processo (JAGIELLO et al., 2017); sendo as questões nano-específicas relacionadas à avaliação de exposição e de comportamento cinético descritas por Teunenbroek, Dijkzeul, Bake (2017) como distintas numa abordagem de avaliação de risco nano-específica, que não deve desconsiderar o potencial impacto de ensaios de segurança biológica no desencadeamento de efeitos e destino observados. Processos de envelhecimento e transformação ao longo do ciclo de vida do nanomaterial e produto no qual se encontra inserido também se mostram relevantes nesse processo (GOTTARDO et al., 2017).

Em assim sendo, pode-se dizer que a abordagem do tipo caso a caso a ser considerada no contexto de materiais de uso em saúde que apresentem nanomateriais em sua constituição compreende não apenas caracterizações físico-químicas minuciosas do nanomaterial a ser

empregado (incluindo-se aquelas relacionadas a tratamentos, modificações, funcionalizações de superfície), mas avaliações de segurança biológica abrangentes que contemplem não apenas a avaliação de respostas biológicas comumente investigadas para nanomateriais, bem como aquelas potencialmente deflagradas pelo uso do produto acabado objeto de interesse, além de análise de cenários de exposição que mimetizem as condições fisiológicas e de funcionamento/aplicabilidade do produto conforme uso pretendido – que envolvam tanto aspectos de segurança biológica (relacionada à identificação, quantificação e caracterização de partículas em nanoescala geradas durante o procedimento de uso ou pelo próprio mecanismo de funcionamento do produto, por exemplo), como de eficácia/funcionalidade a depender das alegações atribuídas ao uso do nanomaterial no produto acabado – para que a partir desse conjunto de informações seja possível identificar situações de perigo, e com base na sua probabilidade de ocorrência e severidade (possível consequência), estimar os riscos delas advindos.

Nesses termos, considerando-se a norma de referência ISO 14971 (2019a), relacionada à aplicação do gerenciamento de risco a dispositivos médicos, de modo geral, e os elementos obtidos por meio das avaliações supra referenciadas, torna-se possível implementar um plano de gestão de risco completo – que conforme disposto por Som et al. (2012) seria essencialmente baseado na avaliação de risco (que incluiria a identificação e caracterização de perigos, avaliação de exposição e caracterização do risco) e no gerenciamento de risco, por meio do qual estratégias de prevenção, mitigação ou comunicação seriam desenvolvidas para implementação segura e sustentável da tecnologia objeto de interesse.

Considerando-se as etapas supramencionadas, pode-se dizer que o objetivo da gestão de risco é fornecer ferramentas para minimizar perigos relacionados ao uso do produto [ou tecnologia] identificados durante a análise de risco (JAGIELLO et al., 2017).

Cumprir pontuar que, apesar de dispor sobre o processo de gerenciamento de risco e sua aplicação ao contexto de dispositivos médicos, a referida norma não define ou estabelece metodologias a serem seguidas pelos fabricantes de dispositivos médicos. Contudo, menção a algumas técnicas para subsidiar a análise de risco dessa categoria produtos é realizada no Anexo B da norma ISO/TR 24971 (2020c), enquanto diretriz para aplicação da norma ISO 14971.

Por todo o exposto, evidencia-se que o processo de gerenciamento de risco deve ser um ciclo contínuo, evolutivo e de revisão periódica, pautado por uma relação risco-benefício favorável aos benefícios proporcionados pelo produto (seja ele ou não de base nanotecnológica) em relação aos riscos residuais e a ele inerentes.

Posto isso, uma outra abordagem que tem se tornado relevante e promissora, por se propor a acelerar o processo de avaliação de risco, ao mesmo tempo em que reduz custos e o número de animais em experimentação, ao efetivamente explorar os dados existentes – é a estratégia integrada para avaliação de toxicidade, conhecida como IATA. Por ela, processos integrados consolidam toda a informação disponível (de exposição e toxicidade) para identificar preocupações relevantes baseadas em exposição e cenários de uso e mapear as informações que melhor enderecem essas preocupações. Para tanto, leva em consideração informações toxicológicas disponíveis e informações básicas obtidas por metodologias ditas não-teste como QSAR, modelagem farmacocinética fisiologicamente baseada e agrupamento. Assim, essa seria uma abordagem direcionada a nanomateriais de preocupação – com base nos níveis de exposição esperada e rotas de exposição, propriedades do material – e estruturada em etapas: a) identificação do nanomaterial de preocupação (características físico-químicas, solubilidade, efeitos de superfície, persistência), b) testagem básica (biocinética, efeitos locais no ponto de entrada ou primeiro contato, genotoxicidade e toxicidade de curto prazo (inflamação, citotoxicidade), c) testagem específica (baseada na seleção e *design* de testes a partir das informações obtidas nas etapas anteriores) (OOMEN et al., 2014).

Por fim, e considerando esse cenário de complexidade, permeado por desafios únicos impostos pela nanotecnologia aplicada, resultantes à natureza e evolução dinâmica dos nanomateriais, às suas propriedades físico-químicas (intrínsecas e extrínsecas), ao seu comportamento e efeitos não plenamente elucidados – é que emerge a mudança de enfoque do processo de avaliação/gerenciamento de risco tradicional (aplicável a nanomateriais, apesar de demandar um alto grau de adaptação e otimização para comportar suas características diferenciadas), para um processo de governança de risco de nanomateriais. Este baseia-se em um conjunto de ações de análise (incluindo-se medidas de prevenção, mitigação ou transferência) e de comunicação do risco (estabelecidas a partir de conhecimentos advindos da caracterização e avaliação de seus potenciais perigos, magnitude de exposição e vias de exposição relacionadas, transporte, destino da tecnologia e seus produtos) – resultantes à condução de testes e *benchmarking* implementados ao longo do ciclo de vida do produto (incluindo-se o cenário de exposição a longo prazo); sendo estruturado a partir de elementos similares e fundamentais à governança de risco, tais como a pré-avaliação de risco, preocupação com risco/ avaliação de segurança, avaliação de risco, gerenciamento de risco, tomada de decisão e monitoramento (ISIGONIS et al., 2020).

Contudo, conforme disposto pelos mesmos autores, a natureza emergente e as importantes lacunas de conhecimento no campo da nanotecnologia, também desafiam a

evolução do processo de governança de risco de nanomateriais, ainda hoje comprometida pela ausência de uma estrutura de gerenciamento de risco definida, de materiais de referência certificados e controles positivos e negativos apropriados, diretrizes de teste oficiais para caracterização e avaliação de toxicidade (ISIGONIS et al., 2020; KROLL et al., 2009), metodologias para compreensão dos impactos sociais das nanotecnologias, estratégias consensuadas para transferência de risco aceitável decorrente dos nanomateriais, de comunicação adequada entre as partes interessadas e a sociedade (ISIGONIS et al., 2020) – o que inclusive perpassa pela necessidade de estruturação ontológica (ou seja, de nomenclaturas, definições que favoreçam a compreensão e a comunicação inequívocas na área) (FADEEL et al., 2007, 2018), assim como pelo viés de publicação e suas implicações na determinação do perfil de risco de nanomateriais (haja vista a tendência de se privilegiar estudos que demonstrem algum efeito toxicológico, em detrimento daqueles que não os evidenciam – o que num cenário de importantes limitações metodológicas pode levar a distorções que gerem preocupações [não necessariamente reais ou proporcionais]) – segundo Warheit & Donner (2015) e Som et al. (2012).

4.2.5 Regulação

No que tange à regulação relacionada à nanotecnologia, essa encontra-se em processo de construção, em especial, no âmbito da União Europeia que, aos poucos, têm incorporado a algumas de suas legislações setor-específicas definições e requisitos relacionados a produtos de base nanotecnológica.

Nesse cenário, a definição de nanomaterial emerge como ponto de destaque em 2011, enquanto recomendação da Comissão Europeia aos Estados membros do bloco. Segundo Rauscher, Sokull-Klüttgen, Stamm (2013), tratar-se-ia de definição direcionada aos setores industrial e regulatório, sendo por isso, ampla e objetiva, ao basear-se no tamanho, como seu principal parâmetro. Por seu caráter geral e não-vinculativo, essa definição apenas balizaria a instituição de definições mais precisas, baseadas em qualificadores ou critérios mais específicos, a depender da categoria de produto a ser aplicada, inclusive no que se refere a casos limítrofes.

Assim, apesar de ser um marco para a regulamentação de nanomateriais e cumprir seu propósito de classificar um material como nanomaterial para fins regulatórios, a definição

recomendada pela Comissão Europeia não seria exaustiva, já que não compreenderia as sutilezas das propriedades nano-específicas expressas por materiais em nanoescala (RAUSCHER; SOKULL-KLÜTTGEN; STAMM, 2013). Propriedades essas também não explicitamente consideradas pela definição firmada pelo regulamento europeu de dispositivos médicos que, por ser a única até então estabelecida nesse âmbito, passou a ser utilizada como referência por outras jurisdições ao redor do globo, incluindo-se o Brasil, em processo final de atualização do principal regramento sanitário na área de dispositivos médicos, que incorpora conceitos e diretrizes importantes à regulação da nanotecnologia em território nacional.

Corroborando os resultados apresentados no capítulo de Avaliação de Segurança Biológica, Wacker; Proykova; Santos (2016) reiteram o minucioso processo de análise requerido para dispositivos médicos constituídos por nanomateriais, essencialmente, norteado pela condução de ensaios de caracterização, aplicáveis tanto ao nanomaterial empregado como ao dispositivo médico [no contexto desta dissertação, ao material de uso em saúde] no qual esteja contido; e de testes de biocompatibilidade – a partir das metodologias analíticas disponíveis e normas técnicas ISO aplicáveis, respectivamente. Práticas que vão ao encontro das recomendações inscritas no documento SCENIHR (2015), quanto à necessária e extensiva caracterização físico-química do nanomaterial empregado e sua avaliação toxicológica (englobando avaliações de cenários de exposição, toxicocinética, e de desfechos toxicológicos relevantes à avaliação de risco requerida).

Ademais, destaque pertinente à responsabilidade do fabricante em determinar a possibilidade ou não de liberação de nanopartículas do dispositivo durante sua aplicação e tempo de contato no organismo, por ser esse um evento importante no contexto de análise e gerenciamento de risco – perante a potencial biodistribuição e persistência do nanomaterial no organismo, também foi realizado por Wacker; Proykova; Santos (2016), reforçando assim a necessidade de uma avaliação bem planejada e pormenorizada, que seja capaz de contemplar todo o ciclo de vida do produto e do nanomaterial nele contido, de modo a viabilizar a identificação máxima de perigos, e por conseguinte, a adequada avaliação e efetivo manejo dos riscos deles advindos.

Contudo, faz-se oportuno salientar que, apesar de se configurar como um cenário teoricamente mapeado, esse carece de sistematização e ferramentas que viabilizem a superação de importantes limitações de ordem prática, que ao longo dos anos têm, não apenas comprometido o avanço da nanotoxicologia enquanto ciência, mas desafiado os sistemas regulatórios globais que, frente à ausência de terminologias, metodologias e metrologias padronizadas pela área (KARAKUS; BILGI; WINKLER, 2020; WANG et al., 2012), [têm tido

seu trabalho de revisão e consolidação do conhecimento disponível para estruturação e alinhamento regulatório dificultados], principalmente, pela ausência de dados consistentes e confiáveis – em geral obtidos por meio de protocolos convencionais sem que aspectos metodológicos relevantes e característicos dos nanomateriais sejam levados em consideração, tal como ocorre com seu potencial de interferência em ensaios de toxicidade (devido a propriedade nano-específicas) e seu comportamento dinâmico em ambiente biológico (modulado pelas características da proteína corona adsorvida a sua superfície) (KARAKUS; BILGI; WINKLER, 2020).

Nesses sentido, o esforço colaborativo e progressivo avanço proporcionado por iniciativas de ordem técnica e orientativa, como aquelas capitaneadas por instituições como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) que dispõe de diversas diretrizes publicizadas no âmbito de nanomateriais (SHIEKH et al., 2020), inclusive no que diz respeito à segurança de nanomateriais manufaturados; pela Organização Internacional de Padronização (ISO)²³, bastante conhecida pela comunidade regulatória por fornecer uma ampla variedade de normas técnicas, inclusive relacionadas à nanotecnologia, nanomateriais e sua segurança; e pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM)²⁴, também dedicada ao suporte nos domínios da caracterização e padronização (WANG et al., 2012) têm desempenhado papel chave na sistematização do conhecimento, no processo de convergência normativa internacional, além de contribuir sobremaneira para o amadurecimento da lógica regulatória global a ser implementado na regularização de produtos de base nanotecnológica – o que não se confunde com o estabelecimento de requisitos regulatórios estanques, haja vista que cada tipo de nanomaterial [a depender de sua aplicação, finalidade, características] requererá uma abordagem distinta, pautada pelo conhecimento constituído e em constante processo de construção (FORLONI, 2012).

Nesse sentido, a análise pré-mercado/pré-registro perpassaria, segundo Forloni (2012), pela revisão de informações relacionadas às propriedades intrínsecas e aplicação desejada, à disponibilidade de informações toxicológicas de materiais análogos [caso aplicável, e a ter sua similitude devidamente evidenciada], ao potencial de exposição, aos reais riscos e benefícios advindos do uso de novos nanomateriais – para que a partir do conjunto de elementos apresentados e avaliados, deliberação sobre sua suficiência ou necessidade de investigação mais aprofundada (pela condução de estudos específicos e complementares) possa ser manifestada pela autoridade sanitária.

²³ Original: *International Organization for Standardization (ISO)*.

²⁴ Original: *American Society for Testing and Materials (ASTM)*

4.2.6 Desafios Nanotoxicológicos e a Nanotoxicologia Preditiva

Por se tratar de uma subárea crítica e relativamente recente, especialmente, no âmbito da Nanomedicina, a Nanotoxicologia tem se deparado com desafios importantes relacionados à insuficiência e inadequabilidade de métodos de teste convencionais às especificidades nanotecnológicas dos materiais em nanoescala (BHATTACHARJEE; BRAYDEN, 2015; GEORGE et al., 2015; HAYNES, 2010; HIRANO, 2009; LEE, 2011; “Of mice and men”, 2009; OSTROWSKI et al., 2009; SHVEDOVA; PIETROIUSTI; KAGAN, 2016) – que vão desde:

a) suas características físico-químicas únicas, com impacto direto sobre seu comportamento em termos biológicos e de toxicidade deflagrada (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; DE MATTEIS; RINALDI, 2018; GEBEL; MARCHAN; HENGSTLER, 2013; HAMMAD; BOLT, 2014; HOBSON, 2016), inclusive em relação a equipamentos e componentes de teste, provocando interferências e erros de leitura com reflexo nos resultados obtidos (ALKILANY et al., 2016; AZHDARZADEH et al., 2015; LEE, 2011);

b) à necessidade de desenvolvimento de modelos realistas que mimetizem as condições biológicas de exposição e interação (AKÇAN et al., 2020);

c) à ausência de protocolos de teste adequados, padronizados, sistematicamente validados e disseminados (inclusive no que tange à definição de controles positivos e negativos adequados e à adoção de dosimetrias realistas, cuja relação dose-resposta suporte a caracterização de eventual perigo) (AKÇAN et al., 2020; ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; AZHDARZADEH et al., 2015; CLIFT; GEHR; ROTHEN-RUTISHAUSER, 2011; DROBNE, 2007; FAN; ALEXEEFF, 2010; GEORGE et al., 2015; HAYNES, 2010; LEE, 2011; LISON; VIETTI; VAN DEN BRULE, 2014; YANG et al., 2020) – que produzam resultados mais assertivos, reprodutíveis, comparáveis entre laboratórios e transponíveis a condições reais de exposição humana (CLIFT; GEHR; ROTHEN-RUTISHAUSER, 2011; HAMMAD; BOLT, 2014; KRUG; KRAEGELOH, 2020; “Of mice and men”, 2009);

d) até a necessidade de infraestrutura apropriada à detecção, caracterização, quantificação e mensuração de nanomateriais em matrizes complexas, bem como ao desenvolvimento de materiais de referência (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; DROBNE, 2007; FAN; ALEXEEFF, 2010; GEORGE et al., 2015; HIRANO, 2009) – haja vista a ausência de ferramentas adequadas, bem como inconsistência entre os vários métodos de

mensuração disponíveis e a ausência de comparabilidade de resultados entre alguns deles (AZHDARZADEH et al., 2015; BHATTACHARJEE; BRAYDEN, 2015).

Confluência de fatores que vem dificultando a compreensão de variáveis de risco, de fato, relacionadas à exposição do organismo humano a nanomateriais, e por conseguinte, a própria condução de avaliações de segurança biológica sob bases científicas sólidas e consistentes.

Autores como Clark; White; Silbergeld (2011), Forest; Hochepped; Pourchez (2019), Özel, et al (2014), Shatkin & Ong (2016) e Pikula et al. (2020) de há muito apontam para a inviabilidade da abordagem de análise de risco caso a caso, a partir de testes e avaliações individualizadas, sob bases *in vitro* e *in vivo* – frente à diversidade de nanomateriais existentes e futuros (SHVEDOVA; PIETROIUSTI; KAGAN, 2016), bem como pelas próprias limitações metodológicas já enfrentadas e ainda hoje persistentes, tais como a ausência de padronização nos ensaios e divergência de resultados entre estudos, por dificultarem a comparabilidade de resultados e a identificação de fatores potencialmente relacionados a riscos e perigos aumentados.

Nesse sentido, esforços direcionados não apenas ao aprimoramento e/ou desenvolvimento de métodos de teste *in vitro* apropriados à avaliação nanotoxicológica (AZHDARZADEH et al., 2015; HUSSAIN et al., 2015), mas ao avanço de metodologias *in silico* (de natureza preditiva, também conhecidos como métodos não-teste) para superação das limitações metodológicas enfrentadas e melhor compreensão mecanística das propriedades nano-específicas e de potenciais riscos relacionados (tais como persistência, estabilidade, decomposição ou aglomeração, solubilidade, degradação (KALANTARI, 2015)) têm sido empreendidos e, por oportuno, impulsionados pelo cenário de discussões éticas relacionadas à redução da experimentação animal e ao desenvolvimento e difusão de métodos alternativos alinhados ao princípio dos 3Rs (BURDEN et al., 2017; CLIFT; GEHR; ROTHENRUTISHAUSER, 2011; DE MATTEIS; RINALDI, 2018; FADEEL; ALENIUS; SAVOLAINEN, 2013; GEORGE et al., 2015; KRAEGELOH, 2018; LEHR et al., 2011; MILOSEVIC; ROMEO; WICK, 2020; PIKULA et al., 2020; SHATKIN; ONG, 2016), com vistas ao alcance de avaliações nanotoxicológicas mais compreensivas e sustentáveis, e por conseguinte, de nanomateriais mais seguros “*safer-by-design*” (BURDEN et al., 2017; CLARK; WHITE; SILBERGELD, 2011; SHATKIN; ONG, 2016).

Sob essa perspectiva, cumpre pontuar que, a idealização da nanotoxicologia preditiva, como ferramenta de otimização das análises toxicológicas e de estimativas de risco relacionadas a nanomateriais de interesse durante seu ciclo de vida, inclusive sob a forma de produto,

remonta a meados dos anos 2000 (DE MATTEIS; RINALDI, 2018; DROBNE, 2007), quando crescimento exponencial no número de publicações em nanotoxicologia passou a ser observado e, simultaneamente, vinculado ao baixo nível de evidencia dos experimentos reportados, seja pela falta de correlação entre resultados obtidos entre testes *in vitro* e *in vivo*, seja pela apresentação de resultados divergentes (ALKILANY et al., 2016; AZHDARZADEH et al., 2015; BHATTACHARJEE; BRAYDEN, 2015; FADEEL; ALENIUS; SAVOLAINEN, 2013; FAN; ALEXEEFF, 2010; FISCHER; CHAN, 2007; GEORGE et al., 2015; KRUG, 2018; OSTROWSKI et al., 2009; RIVERA GIL et al., 2010) – provavelmente, explicados pela variabilidade metodológica dos ensaios utilizados, pela limitada compreensão das propriedades físico-químicas dos nanomateriais e de sua repercussão em sistemas biológicos complexos, bem como pela multifatorialidade relacionada à nanotoxicidade (influenciada por fatores intrínsecos aos nanomateriais e por fatores experimentais) (BHATTACHARJEE; BRAYDEN, 2015; BURDEN et al., 2017; CLARK; WHITE; SILBERGELD, 2011; FISCHER; CHAN, 2007; MILOSEVIC; ROMEO; WICK, 2020; OOMEN et al., 2014).

Realidade que por um lado, alavancou o interesse pelo desenvolvimento e aplicação de métodos preditivos, com vistas à obtenção de dados úteis e confiáveis; mas que por outro, limitou seu avanço, justamente, pela indisponibilidade de um montante expressivo de dados qualificados, necessários à obtenção de previsões confiáveis (FAN; ALEXEEFF, 2010) – o que tem atrasado sobremaneira o desenvolvimento de abordagens preditivas robustas e amplamente difundidas, e por conseguinte, comprometido sua aceitabilidade, como modelos regulatórios adequados à avaliação de risco (BURDEN et al., 2017; GAJEWICZ, 2017; MILOSEVIC; ROMEO; WICK, 2020).

Dentre as abordagens computacionais de natureza preditiva, atualmente, disponíveis e aplicáveis no âmbito da nanotoxicologia, destacam-se os modelos do tipo *read across* (leitura cruzada), árvores de decisão e QSAR – conhecido como modelo de análise quantitativa das relações estrutura-atividade (FOREST; HOICHEPIED; POURCHEZ, 2019) e, considerado o mais bem-sucedido para predição de propriedades biológicas de nanomateriais em ambientes complexos e diversos, por se basear no uso de estatística e algoritmos de aprendizado de máquinas para modelar relações entre a estrutura do material, propriedades moleculares, proveniência e outros parâmetros, além de seus efeitos biológicos (AFANTITIS et al., 2020; KRUG; KRAEGELOH, 2019; OKSEL et al., 2017; TANTRA et al., 2015); sendo também utilizado para derivar estratégias de *design* de nanomateriais mais seguros (KRUG; KRAEGELOH, 2019; SHATKIN, 2020).

Conforme asseverado por Gajewick (2017), Oksel et al (2017) e Winkler (2016), o modelo QSAR tenta ligar os dados de atividade biológica com descritores moleculares teórica ou experimentalmente derivados, razão pela qual requer dados experimentais sistemáticos e suficientemente numerosos, assim como descritores adequados e numericamente relevantes para expressar a variabilidade de estruturas químicas e identificar características-chave relacionadas à toxicidade do nanomaterial avaliado – condições não plenamente alcançadas, e por isso tidas como limitantes à aplicação disseminada desse tipo de abordagem (WINKLER et al., 2012).

Outra estratégia interessante e que tem ganhado espaço no domínio da nanotoxicologia preditiva é a abordagem de leitura cruzada, por seu potencial em preencher lacunas de conhecimento existentes para análise de risco sob uma perspectiva regulatória. Trata-se de um método cujo pressuposto base é a similaridade estrutural entre compostos e a hipótese de que essa similaridade se reflita em similaridade biológica (atividade e resposta biológica, inclusive em termos de toxicocinética e toxicodinâmica) – o que requer a análise de variáveis físico-químicas e mecánísticas relevantes ao desfecho objeto de interesse (GAJEWICZ, 2017; LAMON et al., 2019; WINKLER, 2016). Sua utilização viabiliza o agrupamento de nanomateriais, a priorização de testes em cenários de exposição importantes, ou mesmo de conjuntos de nanomateriais para avaliação futura (FELIU; FADEEL, 2010; LAMON et al., 2019; OOMEN et al., 2014). Para o caso de agrupamentos para desfechos de perigo, as similaridades precisam ser devidamente justificadas, o que pode ser apoiado e otimizado por métodos computacionais (LAMON et al., 2019).

Segundo Fadeel (2015), também figura como referência promissora, a biologia dos sistemas – modelo matemático e computacional de sistemas biológicos complexos, traduzido por plataformas tecnológicas do tipo “*omics*” (*transcriptomics*, *proteomics*, *metabolomics* e *epigenomics*) capazes de não só obter conjuntos de dados complexos, mas de explorá-los e assim, contribuir para o desenvolvimento de modelos quantitativos que descrevam o sistema biológico e sua resposta a perturbações individuais (FADEEL, 2015; FADEEL et al., 2018; RIEBELING et al., 2017).

Sob a ótica de autores como Costa & Fadeel (2015) e Riebeling et al. (2017), por sua abordagem compreensiva, as técnicas *omics* teriam capacidade de triar múltiplos desfechos em um única corrida analítica, independente da avaliação proposta (se de genes, proteínas, metabólitos), por seu enfoque em mudanças a nível molecular. Cumpre, por oportuno, salientar a proeminência conferida à metabolômica, apontada por LV et al. (2015) como escolha ideal para investigações relacionadas às interações nanopartícula-organismo em diferentes níveis

moleculares por fornecer uma leitura funcional do estado celular – manifesto por padrões de expressão alterados de pequenas moléculas rastreáveis a partir de uma abordagem de sistemas – viabilizando assim, a construção da associação mecanística entre padrões metabólicos alterados e toxicidade induzida por nanopartículas, ou seja, o mapeamento das vias metabólicas.

Outra possibilidade preditiva em ascensão, considerada por Clift, Jenkins, Doak (2020), Hussain et al. (2015), Mahto et al. (2014), Milosevic, Romeo e Wick (2020) e Shatkin & Ong (2016), refere-se aos modelos alternativos *in vitro* avançados, instituídos a partir de linhagens celulares humanas correspondentes ao órgão que se deseja avaliar os impactos toxicológicos de exposição ao nanomaterial, para que mimetizem sua estrutura, funcionamento e resposta – mostrando-se, portanto, como estratégias viáveis ao princípio dos 3Rs, que visa em última análise a substituição de experimentos em animais. Nesse contexto, modelos de sistemas multicelulares, modelos 3D “culturas *óides*” e estabelecidos sob condições fisiológicas relevantes (em termos de acondicionamento, suprimento e fluídica) assumem destaque, sendo a estrutura *AOP* (*adverse outcome pathway*)²⁵ ferramenta importante na predição oferecida por esse tipo de modelo. Segundo Chen et al (2018), sob uma abordagem integrada, essa estrutura viabilizaria a elucidação de mecanismos toxicológicos, podendo inclusive ser associada a modelos computacionais e ferramentas de triagem de alto rendimento *in vitro* para uma avaliação de risco mais célere, assertiva, factível e sustentável ao crescente número de nanomateriais desenvolvidos.

Contudo, apesar de se constituir como uma abordagem promissora e toxicologicamente realista à superação de vários desafios atuais nas avaliações químicas e de segurança nano-específicas, em franco progresso nos últimos anos, a estrutura *AOP* ainda precisa trilhar um longo caminho até a aceitação, confiabilidade e por oportuno, substituição dos testes realizados em animais por abordagens não-animais (EDE et al., 2020).

Por todo esse cenário, ações como maior padronização em todos os estágios dos estudos de toxicidade (desde os materiais de partida até os desfechos estabelecidos), caracterização físico-química apropriada, desenvolvimento de materiais de referência padronizados para condução dos testes de toxicidade, estudos desenhados específica e sistematicamente para avaliar o papel das propriedades físico-químicas no comportamento dos nanomateriais e nas suas interações biológicas, sob condições diversas para que variações nas propriedades dos nanomateriais também possam ter seus impactos avaliados (CLARK; WHITE; SILBERGELD, 2011) – são apontadas como imperativas ao avanço e consolidação do conhecimento

²⁵ Tradução nossa: *Adverse Outcome pathway* (*AOP*) = Via de Resultado Adverso.

nanotoxicológico, bem como das metodologias computacionais nesse campo, ainda em progressão devido à relativa escassez (qualitativa e quantitativa) de dados experimentais confiáveis relacionados à resposta biológica deflagrada por nanomateriais (AFANTITIS et al., 2020; BAÑARES et al., 2017; FOREST; HOCHEPIED; POURCHEZ, 2019; LAI, 2015; MILOSEVIC; ROMEO; WICK, 2020; SHATKIN; ONG, 2016), mas bastante promissoras à compreensão do impacto das nanopartículas nos níveis molecular, celular, tecidual, de órgãos e sistemas e, dos efeitos biológicos chave por elas desencadeados (BAÑARES et al., 2017; OKSEL et al., 2017).

Para Burden et al. (2017); Forest, Hochepped, Pourchez (2019) e Shatkin & Ong (2016) as abordagens *in silico* teriam potencial para substituição parcial das abordagens convencionais e composição de estratégias de avaliação integrada (baseadas na combinação de dados já existentes, testes experimentais e ferramentas analíticas, constituindo-se assim em abordagem de teste em camadas) e do tipo peso de evidência no longo prazo, para tomada de decisões sobre riscos e perigos com o objetivo de minimizar a necessidade de testes para cada nano formulação – realidade plenamente concebível e desejável em uma conjuntura regulatória pressionada pelo advento de novos e diversos nanomateriais, pela ausência e/ou incompletude de dados de caracterização, pela notória variabilidade de nanobioensaios, pela falta de padronização em nomenclatura, métricas e materiais (FAN; ALEXEEFF, 2010; KRUG, 2018; KRUG; KRAEGELOH, 2020; LISON; VIETTI; VAN DEN BRULE, 2014; SHATKIN, 2020).

Ademais, melhoria na qualidade das publicações associada ao reporte de informações básicas relevantes como – adequada caracterização de propriedades físico-químicas e sistema-dependentes importantes para apoiar as conclusões dos estudos, dose avaliada e medida de dose empregada, descrição detalhada do protocolo de exposição, exclusão de possíveis interferências e inclusão de controles positivo e negativo apropriados, descrição apropriada dos algoritmos e métodos utilizados na análise de dados (AZHDARZADEH et al., 2015; KRAEGELOH, 2018; KRUG, 2018; KRUG; WICK, 2011; MARCHESE ROBINSON et al., 2016); e principalmente, consideração e análise de aspectos cruciais à interpretação congruente de achados obtidos em estudos nanotoxicológicos, como – avaliação de impurezas/substâncias químicas residuais provenientes do processo de síntese das nanopartículas, enquanto potencial fonte de toxicidade; correlação entre a dosagem testada *in vitro* e aquela a ser administrada *in vivo*, associadas à consideração de fatores como a dispersão de nanopartículas em meio fisiológico, a velocidade de difusão ou sedimentação na avaliação de captura intracelular; tipo celular utilizado nos ensaios *in vitro* (frente à variação de resposta celular a uma mesma nanopartícula, a depender do tipo, momento do ciclo, perfil de captura e densidade celular) e sua dimensionalidade

(considerando a limitação de culturas de células 2D em termos de estrutura e funcionalidade teciduais); alterações das características e propriedades de superfície provocadas pela adsorção de “proteína corona” e seu impacto sobre a nanobiointeração, alteração da estabilidade coloidal em meio biológico por influência do meio utilizado e local de exposição, ocorrência de agregação, com alteração de comportamento e penetrabilidade do nanomaterial (ALKILANY et al., 2016; AZHDARZADEH et al., 2015; HUSSAIN et al., 2015; LISON; VIETTI; VAN DEN BRULE, 2014; MARCHESE ROBINSON et al., 2016; RIVERA GIL et al., 2010) – sinalizam para a premente necessidade de melhores práticas, traduzidas pela adoção de critérios e controles de completude e qualidade para verificação e aceitação da literatura científica, o que invariavelmente perpassa pela disponibilização de informações mínimas relevantes, bem como pela padronização e harmonização de protocolos para que os efeitos observados sejam corretamente compreendidos e estimados quanto a sua gravidade (HUSSAIN et al., 2015; KRUG, 2018; MARCHESE ROBINSON et al., 2016; YANG et al., 2020).

Isso porque, o corpo de evidência sobre o qual a Nanotoxicologia se consolidou, foi em grande parte construído sob bases limitadas, a partir de estudos em modelo *in vitro* – conduzidos sob uma variedade de modelos cujos efeitos toxicológicos não foram, em sua maioria, validados por modelos *in vivo*; marcados pela escassez de controles ou nanomateriais de referência disponíveis para condução de estudos nanotoxicológicos (HUSSAIN et al., 2015); bem como pela variabilidade e não reprodutibilidade dos métodos de caracterização empregados; inconsistência dos nanomateriais disponíveis para estudo (variações lote a lote importantes relacionadas a características como tamanho, forma, propriedades de superfície, desvios na descrição contida na rotulagem); dados majoritariamente baseados em nanomateriais de primeira geração (nanomateriais passivos e nanoestruturas), nem sempre extrapoláveis a tecnologias mais avançadas que, provavelmente, demandarão o desenvolvimento de métricas e métodos mais apropriados (SHATKIN, 2020); incertezas quanto à métrica de dose apropriada (massa, área de superfície, concentração de partículas); dificuldade na detecção e quantificação de nanomateriais em tecidos; mudança nas propriedades físico-químicas dos nanomateriais com o tempo, manuseio e ambientes biológicos de exposição; escassez de dados de exposição a longo prazo (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; GEBEL; MARCHAN; HENGSTLER, 2013; KRUG; WICK, 2011; OSTROWSKI et al., 2009) – condições que em conjunto não podem ser desconsideradas num contexto de análise e interpretação crítica de resultados.

Nesse sentido, iniciativas baseadas na instituição de sistemas para organização, armazenamento e compartilhamento de informações abertas e suficientemente amplas

(CLARK; WHITE; SILBERGELD, 2011) e na consolidação de bibliotecas de dados de caracterização físico-química e de desfechos biológicos relevantes, tal como a plataforma NanoSolveIT (ainda em desenvolvimento) tornar-se-iam ferramentas úteis à superação de dificuldades enfrentadas tanto na avaliação de risco de nanomateriais, essencialmente, baseada em dados provenientes de análises *in vitro* e *in vivo* convencionalmente realizadas; quanto naquelas relacionadas aos persistentes desafios ligados às avaliações de longo prazo, sob condições de exposição a baixas doses e a impactos biológicos de nanomateriais multicomponentes – por se constituírem como subsídio à abordagem preditiva *in silico*, frente ao seu potencial para avaliações complexas e em ambientes diversos, ideal à condução de avaliação de risco compreensiva e ao progresso da pesquisa em nanosseguurança (AFANTITIS et al., 2020; LAI, 2015; MAOJO et al., 2012; PIKULA et al., 2020).

Evidencia-se, portanto, que, o desenvolvimento de métodos *in silico* para apoiar a avaliação de risco e a tomada de decisão regulatória baseada em risco, assim como para otimizar o processo de manufatura para assistir o *design* de produtos ou materiais mais seguros revela-se como tendência importante e necessária ao acompanhamento e progressão nanotecnológica, especialmente, em termos de segurança. Para tanto, essas metodologias devem buscar e seguir os mais altos e amplamente aceitos padrões de qualidade, o que necessariamente inclui processos de validação interna (para avaliação da acurácia da predição com base no conjunto de dados empregados) e externa (para avaliação da confiabilidade e aplicabilidade do modelo), enquanto etapas decisivas à determinação do verdadeiro poder preditivo do modelo, premissa ainda não alcançada pela maioria dos modelos nano-QSAR, conforme disposto por Gajewicz (2017), Oksel et al. (2017) e Tantra et al. (2015) – motivo pelo qual sua implementação enquanto ferramenta preditiva válida e aceita internacionalmente ainda levará algum tempo (TANTRA et al., 2015).

Conforme asseverado por Winkler (2016), apesar do progresso alcançado nos últimos anos, ainda há um longo caminho a ser percorrido antes que se possa fornecer aos reguladores dados de alta qualidade, modelos preditivos validados, detalhes mecânicos elucidados e ferramentas para suporte a decisões sobre nanomateriais de aplicações diversas.

4.3 ANÁLISE E REFLEXÕES À LUZ DAS PERGUNTAS NORTEADORAS PROPOSTAS PELA REVISÃO DE ESCOPO

A partir dos achados de literatura obtidos por meio da revisão de escopo realizada, baseada em estratégia de busca estruturada, mas balizada por critérios de elegibilidade extensivos, pela própria natureza e finalidade do tipo de revisão proposta, dedicada ao mapeamento de escopo temático amplo – pôde-se constatar seu alinhamento às disposições constantes em publicações, documentos/diretrizes e normas técnicas relacionados à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica identificados pela estratégia de busca livre implementada inicialmente.

Nesse sentido, tomando-se como referência a perspectiva regulatória de análise de segurança biológica implementada no âmbito de dispositivos médicos, bem como as especificidades nanotecnológicas descritas pela ampla literatura consultada (de escopo geral e específico ao contexto de aplicação biomédica, com enfoque em dispositivos médicos de base nanotecnológica enquadrados na categoria “materiais de uso em saúde”) – foram identificadas importantes peculiaridades a serem observadas na condução da avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica em relação à avaliação comumente realizada para fins de regularização de dispositivos médicos, de modo geral, com vistas à obtenção de resultados confiáveis e assertivos.

Conforme já apresentado e a seguir evidenciado, pode-se dizer que a avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos de base nanotecnológica se diferencia da avaliação ordinária em termos:

- metodológicos (frente à necessidade de adequações dos métodos existentes, à inaplicabilidade de alguns deles à avaliação de nanomateriais, à necessária condução de diferentes testes destinados à avaliação de um mesmo desfecho para interpretação apropriada dos achados identificados e exclusão de potenciais interferências);

- procedimentais (por ainda carecer de padronizações em relação à determinação de materiais de referência, à inclusão de controles positivo e negativo, preparo de amostra, condução de análises físico-químicas compreensivas – que considerem o nanomaterial sintético, incorporado ao dispositivo médico acabado e sob condições que mimetizem o ambiente biológico de exposição, inclusive para identificação de perigos relacionados ao seu comportamento em diferentes perspectivas e apresentações);

- e a nível de testes – considerando-se a condução de avaliações mais específicas e extensivas que aquelas comumente observadas no contexto de dispositivos médicos regulares, tais como análise físico-química, morfológica e topográfica (quando aplicável); liberação de lixiviáveis; toxicocinética; toxicidade sistema-específico (caso aplicável); pirogenicidade; imunotoxicidade e degradação.

No que tange aos desafios relacionados à avaliação de segurança biológica no contexto nanotecnológico, esses se confundem com as limitações metodológicas resultantes à inespecificidade dos métodos empregados na análise de nanomateriais, apesar de também imbricados à evolução do conhecimento em nanotecnologia, ainda em construção e, por isso, cheio de lacunas – condição que inclusive tem comprometido o avanço de estratégias para o seu manejo, há muito centradas no desenvolvimento da nanotoxicologia preditiva, ainda restrita a modelos não validados e dependentes de insumos científicos qualificados e que estejam disponíveis em larga escala, o que não encontra ressonância no crescente e vultoso número de publicações realizadas no campo da nanotoxicologia, em sua maioria, de qualidade limitada por déficits metodológicos e de reporte.

4.3.1 Como os desafios regulatórios relacionados à avaliação de segurança biológica aplicada a dispositivos médicos categorizados como materiais de uso em saúde de base nanotecnológica se diferenciam em relação ao contexto de análise regular?

Por se tratar de um campo emergente, multidisciplinar e dinâmico, cujo conhecimento encontra-se em constante evolução, a Nanotecnologia impõe importantes desafios à regulação sanitária, frente aos riscos não plenamente conhecidos e, mesmo incertos, especialmente, no âmbito da saúde humana. Realidade que tem direcionado o debate e as preocupações regulatórias ao potencial toxicológico de nanomateriais contidos nas mais diversas categorias de produtos, dentre as quais se incluem os dispositivos médicos enquadrados como materiais de uso em saúde.

Questão relevante e que, ainda hoje, repercute na prática regulatória global, não só na área de dispositivos médicos de base nanotecnológica, é a ausência de terminologias e definições harmonizadas que favoreçam a compreensão e consolidação de entendimentos inequívocos a respeito do que sejam nanomateriais e termos a eles relacionados. Condição

facilmente evidenciada pela lacuna regulatória manifesta por e entre as diversas jurisdições – resultante à ausência de definições ou disposições nano-relacionadas em regulamentos ou guias orientativos; ou pelas disparidades existentes entre os conceitos adotados, seja no âmbito das normas *ISO* dedicadas à temática Nanotecnologia e do regulamento europeu de dispositivos médicos (*MDR*), seja do entendimento manifesto pela *FDA*, por meio da publicização de diretrizes finais à indústria sobre produtos que envolvam a aplicação de nanotecnologia – e que sujeita o setor regulado ao ônus de se adequar ao cumprimento de requisitos normativos variáveis, não expressamente estabelecidos, e por isso não alinhados entre as diferentes jurisdições.

Contudo, faz-se necessário ponderar que a grande diversidade e variabilidade de nanomateriais, bem como de suas potencialidades em termos de aplicação, rotas de exposição, apresentação (livre, fixo, incorporado) e propriedades manifestas nos produtos que os contêm, associadas às lacunas de conhecimento ainda existentes no campo da nanotecnologia – impõem dificuldades não apenas ao estabelecimento e consolidação de uma ontologia completa e suficientemente abrangente, mas também à determinação de requisitos nano-específicos mínimos, que sejam amplamente aplicáveis a materiais de uso em saúde de base nanotecnológica (também bastante diversos), bem como harmonizados entre as diferentes autoridades regulatórias – aspecto que também perpassa pela indisponibilidade técnica de infraestrutura, recursos e/ou soluções metodológicas e metrológicas apropriadas às demandas apresentadas.

Tal conjuntura, de certa forma, acaba por justificar a realidade regulatória global, ao mesmo tempo que sinaliza para a necessidade de avanço, pelo menos em termos de elucidação, direcionamento e orientação regulatória, a partir do conhecimento progressivamente gerado – contexto que inclusive motivou o propósito deste trabalho: apresentar diretrizes regulatórias base à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos enquadrados como materiais de uso em saúde de base nanotecnológica, a partir do conhecimento corrente.

Outro desafio importante relaciona-se à baixa disponibilidade de dados nanotoxicológicos qualificados, a despeito do crescente e já vultoso número de publicações no campo da Nanotoxicologia, que ainda carece de metodologias analíticas e experimentais adequadas, padronizadas e validadas para avaliação toxicológica de nanomateriais (FOULKES et al., 2020), bem como de reporte detalhado dos procedimentos executados – conjunção de fatores que tem comprometido a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados gerados, que acabam tendo sua aplicabilidade para fins regulatórios limitada. Realidade essa que pode ser explicada, em partes, pelo fato de as pesquisas em nanosseguurança serem predominantemente

orientadas “para ciência” e não “para regulação” – que requer dados bem definidos, padronizados, reprodutíveis, confiáveis e intercambiáveis (TEUNENBROEK; DIJKZEUL; BAKE, 2017).

Ademais, a própria capacidade inventiva aplicada à geração de novos nanomateriais, cada vez mais complexos desafia a consolidação de uma compreensão mais sofisticada quanto à interação biológica desses materiais, com vistas à antecipação e redução de potenciais efeitos danosos (TEUNENBROEK; DIJKZEUL; BAKE, 2017); assim como a própria adequabilidade das técnicas e metodologias disponíveis para avaliação desses nanomateriais, que podem requer o desenvolvimento de novos métodos.

Outro aspecto pontuado por Jagiello et al. (2017) refere-se às limitações inerentes à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos, de modo geral, amparada por testes majoritariamente *in vivo* que, inclusive podem não refletir os reais efeitos observados no organismo humano; por testes aplicáveis a substâncias convencionais e que não levam em consideração características específicas de materiais inovadores e; que [apesar de implementada sob uma perspectiva de risco] ainda carece de um processo de tomada de decisão associado ao gerenciamento de risco, a ser desenvolvido futuramente. Outrossim, ensaios *in vitro* tradicionais também têm se mostrado inadequados à avaliação de nanomateriais que por suas características físico-químicas podem interagir com reagentes, interferir nos mecanismos de detecção e impactar a leitura e interpretação de resultados (FOULKES et al., 2020; SIEGRIST et al., 2019).

A escassez de dados relacionados às várias fases do ciclo de vida do nanomaterial é outro aspecto sinalizado por Teunenbroek, Dijkzeul, Bake (2017), haja vista sua importância tanto para identificação de transformações ocorridas ao longo do tempo de exposição, como de testes de segurança biológica específicos e necessários à compreensão dos fenômenos de mudança e suas potenciais repercussões no organismo.

Outras questões não resolvidas em relação aos testes de segurança biológica, relacionam-se à escassez de ensaios adequados e realistas para estabelecer a natureza das nanopartículas liberadas, à falta de metodologia para determinar a distribuição das nanopartículas liberadas (estudos toxicocinéticos) [e seu potencial para acúmulo], à falta de modelos *in vitro* realistas para identificação de perigos relacionados a nanobiomateriais conforme a rota de exposição (inalação, injeção, dérmica) e a duração do contato (toxicidade aguda e crônica) (JAGIELLO et al., 2017).

Essa realidade expõe as persistentes lacunas de conhecimento relacionadas à caracterização de nanomateriais, bem como aos seus mecanismos biológicos, modos de ação e

toxicocinética no organismo humano; e reforça a necessidade de avanço nos processos de sistematização, padronização e validação metodológicas com vistas à superação de artefatos, interferências e eventuais confundidores, para obtenção de resultados confiáveis e reproduzíveis que contribuam para o progresso de abordagens do tipo peso de evidencia (baseada em análise comparativa entre estudos) e preditiva, baseada em métodos *in vitro* e *in silico* – fundamentais em um cenário de evolução e crescente diversidade de nanomateriais, além de estratégicas ao processamento conjunto e integrado de dados rumo a uma perspectiva futura de análise por agrupamento ou categorização de nanomateriais que viabilize a racionalização e otimização de recursos – mas também para a melhoria geral da qualidade e completude das evidências geradas.

Por fim, sobre os testes de avaliação de segurança biológica (previstos pela série ISO 10993) e sua aplicação a materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, cumpre destacar algumas peculiaridades e aspectos relevantes a serem considerados, enquanto desafios, quando da sua escolha e consecução:

- Teste de Citotoxicidade: recomenda-se a combinação de dois ou mais ensaios que avaliem desfechos distintos para uma interpretação mais assertiva dos resultados obtidos. Isso porque, a alta reatividade de alguns nanomateriais pode resultar em interações e interferências indesejadas com sistemas de teste de base colorimétrica, comprometendo sua leitura e análise de resultados.

- Teste de Sensibilização: apenas o Teste de Maximização em Porquinhos-da-Índia seria recomendado para análise de nanomateriais, por requerer aplicação intradérmica da amostra-teste;

- Teste de Reatividade Intracutânea: por requerer aplicação intradérmica mostra-se como estratégia mais sensível à avaliação de nanomateriais, inclusive para aqueles de natureza hidrofóbica;

- Teste de Pirogenicidade: torna-se ainda mais importante e necessário no contexto de análise dos nanomateriais, frente ao alto potencial de adsorção de endotoxinas à superfície de nanomateriais (fator confundidor importante a ser considerado e, necessariamente, descartado ou confirmado no cenário de avaliação de segurança biológica);

- Teste de Toxicidade Sistêmica: recomendado frente à possibilidade de translocação e acúmulo de nanomateriais em sistemas biológicos distintos, em relação àquele inicialmente exposto;

- Testes de Genotoxicidade: devem ser conduzidos sob uma abordagem do tipo bateria de testes, com vistas à avaliação de diferentes mecanismos de indução de danos genéticos.

Contudo, no contexto de análise de nanomateriais, o teste de AMES não deve ser utilizado, frente a sua propensão a resultados falso-negativos. Nesse sentido, figuram como testes *in vitro* recomendados: Teste de Mutação Gênica em células de linfoma de rato, Teste de Micronúcleo e Teste do Cometa;

- Teste de Toxicocinética: é especialmente indicado para produtos que possuam nanomateriais livres ou que sofram processos de degradação, desgaste, atrito, abrasão, polimento, corrosão que gerem nano-objetos;

- Teste de Imunotoxicidade: deve ser considerado frente a nanomateriais de potencial imunogênico desconhecido.

4.3.2 Como esses desafios têm sido tratados? Como a avaliação de dispositivos médicos de base nanotecnológica tem avançado para superar os desafios e dificuldades inerentes a esse contexto?

Evolução na instituição de terminologia harmonizada e consistente assegura uma compreensão comum de conceitos e ferramentas entre especialistas e partes interessadas (tais como autoridades regulatórias, indústria e consumidores) (GOTTARDO et al., 2017), além de viabilizar acesso a um escopo ampliado de dados e informações disponíveis em relação a determinado termo.

Nesse sentido, movimento de convergência regulatória em torno da definição de naomaterial, a ser adotada no âmbito de dispositivos médicos, tem sido observado nos últimos anos, haja vista a mobilização de agências reguladoras de países pertencentes ao bloco econômico sul-americano – Mercosul, em revisar e atualizar seus regulamentos, incorporando a eles definições e aspectos relevantes ao processo de inovação tecnológico, inclusive relacionados à nanotecnologia. Para tanto, destaque merece ser dado ao Brasil, representado pela Anvisa, que hoje tem seu principal regulamento na área de dispositivos médicos, em fase final de revisão (por meio da Consulta Pública nº 730/2019), tendo esse sido alinhado às principais disposições constantes no Regulamento Europeu de Dispositivos Médicos (*MDR*), incluindo-se aquelas relativas à definição de nanomaterial e regra de enquadramento especificamente dedicada a dispositivos de base nanotecnológica (ANVISA, 2019). Outra jurisdição importante nesse processo de harmonização, e que vem discutindo a viabilidade de adequar sua legislação ao *MDR*, é a Austrália, representada por sua Agência Reguladora –

Therapeutic Goods Administration (TGA) por meio de consulta pública divulgada em fevereiro de 2021, onde aventa algumas possibilidades quanto à inclusão de disposições relacionadas a dispositivos médicos que contenham nanomateriais, incluindo-se a adoção de definições instituídas pelo *MDR* (AUSTRALIA, 2021). Logo, concluídas as consultas públicas supramencionadas, maior previsibilidade regulatória será auferida pelas jurisdições envolvidas, o que resultará não apenas em maior harmonização e alinhamento global na regulação de dispositivos médicos, mas em melhores perspectivas de crescimento e oportunidades de inovação em nanotecnologia no âmbito da indústria biomédica.

Com vistas à superação das diversas limitações metodológicas enfrentadas pelo campo da Nanotoxicologia, de modo geral, muito tem sido investido em pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de metodologias alternativas baseadas no desenvolvimento de modelos *in vitro* realistas e confiáveis, tal como a triagem de alto rendimento para identificação de perigos e efeitos adversos à saúde humana, inclusive para uso em dispositivos médicos e produtos de terapia avançada; bem como de modelos *in silico* baseados em metodologia computacional para predição desses mesmos riscos; e de Estratégias de Teste Inteligentes, resultantes à integração entre modelos *in silico* e metodologias experimentais (JAGIELLO et al., 2017; TEUNENBROEK; DIJKZEUL; BAKE, 2017).

Contudo, apesar de promissores todos esses modelos ainda se encontram em estágio inicial de desenvolvimento, não tendo sido, portanto, validados para aplicação extensiva, enquanto estratégias para agrupamento de nanomateriais, por exemplo – motivo pelo qual atualmente não são aceitos para fins regulatórios.

Conforme asseverado por Jagiello et al. (2017), cooperação entre representantes da indústria de materiais, indústria biomédica, pesquisadores científicos (incluindo-se ambos experimentalistas e modeladores) e, finalmente, reguladores; associada ao compartilhamento e acesso a dados qualificados sob curadoria (TEUNENBROEK; DIJKZEUL; BAKE, 2017) mostram-se como estratégias necessárias à superação dos desafios ora enfrentados, bem como à evolução sólida e sustentada do conhecimento no âmbito da nanotoxicologia aplicada.

A esse respeito vale ressaltar a necessidade de maior alinhamento entre os campos científico e regulatório, com participação mais ativa de entes reguladores na indicação de necessidades por maior conhecimento científico, definição de tópicos de pesquisa e orientação quanto a sua condução (inclusive no que tange ao rigor metodológico), para que dados experimentais resultantes a projetos demandados possam ser aproveitados para fins regulatórios (TEUNENBROEK; DIJKZEUL; BAKE, 2017).

Aspecto oportuno a ser considerado nesse contexto de avanço e que não deve ser desconsiderado, relaciona-se à estratégia e implementação do conceito *Safety by design*, aplicado ao processo de inovação como um todo, desde a fase de projeto (idealização das propriedades físico-químicas e funcionais do nanomaterial a ser incorporado ao produto), passando pela escolha do nanomaterial e seu processamento, incorporação ao produto durante o processo de manufatura até a obtenção do produto acabado – com vistas ao alcance de nanomateriais mais seguros e adequados ao propósito de uso requerido, sendo seu perfil de segurança estabelecido a partir das análises de caracterização e de segurança biológica aplicáveis ao caso concreto objeto de interesse.

5 PROPOSIÇÃO REGULATÓRIA

Por se tratar de uma área multidisciplinar que envolve ciência de materiais, biologia, física, química e engenharia (SOLAÍMAN et al., 2017), a Nanotecnologia estabelece interface com diversas áreas, o que a torna uma tecnologia atraente e com grande potencial para inovação, inclusive no cenário biomédico.

Contudo, preocupações relacionadas a sua segurança em contextos de exposição humana persistem, muito pelas lacunas de conhecimento existentes quanto aos seus efeitos e potenciais riscos à saúde humana – realidade que tem impulsionado o avanço de estudos nanotoxicológicos mas, de certo modo, comprometido abordagens regulatórias específicas e direcionadas a produtos de base nanotecnológica, frente às incertezas que ainda permeiam essa tecnologia emergente e dinâmica.

Nesse sentido, estratégias regulatórias mais flexíveis, de natureza orientativa e não mandatória que estabeleçam diretrizes gerais à consecução de informações minimamente relevantes num contexto de avaliação de segurança biológica podem se revelar como ferramentas úteis ao processo de amadurecimento e consolidação de conhecimentos em construção, como aqueles relacionados aos campos da nanotecnologia, nanomedicina e nanotoxicologia.

Sob essa perspectiva é que se propõe, a partir de extensa revisão bibliográfica (baseada em publicações diversas, normas técnicas, legislações e documentos técnicos), a apresentação de diretrizes regulatórias nacionais para subsidiar a avaliação de segurança biológica de Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, sob uma perspectiva de risco, e assim proporcionar ao público interessado nessa temática, suporte técnico-científico ao planejamento e condução de uma avaliação nanotoxicológica compreensiva e alinhada ao conhecimento corrente, bem como à legislação sanitária vigente – com o intuito de subsidiar a comprovação de segurança biológica do produto objeto de interesse a ser regularizado.

A base normativa utilizada para estruturação das diretrizes aqui propostas foi constituída por regulamentos sanitários aplicáveis a dispositivos médicos, de modo geral – neste caso, a Resolução RDC n° 185/2001 (por dispor sobre o processo de regularização de dispositivos médicos), que se encontra em processo final de revisão, tendo por isso sido utilizada parte do texto da Consulta Pública 730.2019, no que tange à definição de nanomaterial e classificação de risco de dispositivos médicos de base nanotecnológica, e a Resolução RDC n° 546/2021 que

dispõe sobre os requisitos mínimos para comprovação de segurança e eficácia de produtos para saúde. Tendo esta sido complementada por disposições constantes nas normas técnicas aplicáveis à caracterização físico-química de nanomateriais engenheirados para avaliação toxicológica (*Technical Report* ISO/TR 13014:2012), à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos (série ISO 10993 – Partes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 33, incluindo-se aquela dedicada a nanomateriais – *Technical Report* ISO/TR 10993: 22), ao gerenciamento de risco de dispositivos médicos (ISO 14971 e ISO/TR 24971) e à avaliação de risco de nanomateriais (ISO/TR 13121).

Tomando-se como referência a definição de nanomaterial adotada pela Resolução que substituirá a RDC nº 185/2001, e que versará sobre os regimes de regularização, classificação de risco e requisitos de rotulagem e instruções de uso aplicáveis a dispositivos médicos, incluindo-se aqueles categorizados como materiais de uso em saúde que contenham ou incorporem nanomateriais, esse será descrito como:

[todo] material natural, incidental ou manufaturado que contém partículas em estado não ligado ou sob a forma de agregado ou aglomerado, em que 50% ou mais do número de partículas apresente distribuição de tamanho dentro do intervalo de 1 a 100 nm, em uma ou mais de suas dimensões externas. Fullerenos, flocos de grafeno e nanotubos de carbono de parede simples com uma ou mais dimensões externas inferiores a 1 nm também são considerados nanomateriais. Materiais manufaturados com dimensões que extrapolem o limite superior da nanoescala (estabelecida entre 1 e 100 nm), até o marco de 1000 nm, e que exibam propriedades ou fenômenos tamanho-dependentes distintos daqueles apresentados pelo mesmo material em macroescala, poderão ser enquadrados na definição de nanomaterial (ANVISA, 2019).

Nesses termos, materiais de uso em saúde que se destinem à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utilizem meios farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos; e que incorporem ou sejam constituídos por nanomateriais – passarão a ser expressamente reconhecidos pela legislação sanitária nacional, sendo inclusive sujeitos à regra de enquadramento específica. Quanto à classificação de risco, essa será estabelecida com base no potencial de exposição interna a que o organismo estiver submetido quando do uso/aplicação desse tipo de produto – que poderá ser classificado como classe de risco II (médio risco – por seu insignificante potencial de exposição interna), III (alto risco – por seu baixo potencial de exposição interna) ou IV (máximo risco – por seu elevado potencial de exposição interna)

(ANVISA, 2019), seguindo a lógica estabelecida pelo Regulamento europeu de dispositivos médicos.

Conforme expressamente disposto, serão abarcados por essa definição não apenas os nanomateriais manufaturados (materiais intencionalmente produzidos dentro do intervalo dimensional da nanoescala por manifestar composição ou propriedades especificadas (ISO, 2015a), mas também os de origem natural (não projetados) e incidental (gerados como subproduto não intencional de um processo) (ISO, 2015a) – por serem passíveis de ocorrência no contexto de materiais de uso em saúde. Por oportuno, vale ressaltar que frente à crescente demanda por novas aplicações e especificidades, inclusive no âmbito da medicina, maior ênfase tem sido dada aos nanomateriais manufaturados, que por seu caráter “não-natural” (projetado), despertam maiores preocupações em relação à saúde humana, requerendo por isso abordagem mais criteriosa na condução da avaliação de segurança biológica requerida para fins regulatórios.

Ademais, considerando-se a ausência de consenso entre as definições utilizadas pela comunidade científica e autoridades regulatórias ao redor do globo; a percepção, em geral, aceita de que nanomateriais teriam como características definidoras: tamanho em nanoescala (normalmente estabelecida entre 1 e 100 nm) e propriedades únicas dependentes de tamanho, não exibidas pelo material a granel (*bulk*) (GUBALA et al., 2018) e; o fato de haver diferenças de entendimento entre jurisdições quanto ao enquadramento sanitário de determinados produtos e quanto à definição (regulatória ou de trabalho) adotada para nanomateriais – é que ambas as possibilidades (tamanho e propriedades) foram contempladas na definição da futura legislação nacional.

A dissonância supra referenciada pode ser, inclusive observada em relação à definição disposta pela norma ISO/TS 80004-2 (2015a), adotada pela norma ISO/TR 10993-22 (2017a) que estabelece como nanomaterial “material com qualquer dimensão externa na nanoescala ou que tenha estrutura interna ou estrutura de superfície na nanoescala”, estando nesse termo abarcados dois outros conceitos, o de nano-objetos (termo genérico utilizado para designar parte de um material com uma, duas ou três dimensões em nanoescala) e material nanoestruturado (aquele que tenha nanoestrutura interna ou nanoestrutura de superfície) – definição que não substitui ou se sobrepõe à definição regulatória nacional, mas que pode ser útil e plenamente aplicável à realidade de materiais de uso em saúde, por compreender aspectos pertinentes à nanoestrutura não contemplados pelo regulamento sanitário.

Aspecto importante e peculiar à realidade de materiais de uso em saúde, inclusive abarcado pela abrangência da definição disposta na futura Resolução, relaciona-se à avaliação

de nano-objetos gerados como produtos de degradação, desgaste ou de processos de tratamento mecânico de dispositivos médicos ou componentes fabricados sem o uso de nanomateriais – que conforme a finalidade do produto, seu mecanismo de funcionamento e especificidades técnicas, composição, nível e duração de exposição deve ser considerada.

Para delimitação das informações pertinentes à avaliação de segurança biológica aplicada a materiais de uso em saúde que contenham, sejam constituídos ou que produzam nano-objetos, optou-se por uma abordagem conservadora estruturada em cinco seções: contextualização sobre materiais de uso em saúde que sejam constituídos ou incorporem nanomateriais; requisitos essenciais de segurança aplicáveis a essa categoria de produtos, segundo a Resolução RDC nº 546/2021; caracterização físico-química do nanomaterial empregado; avaliação de segurança biológica do produto acabado, sob uma perspectiva de risco; e reporte detalhado de informações.

Cumprir enfatizar que, as diretrizes ora apresentadas foram elaboradas com base no conhecimento atualmente disponível, com o objetivo de elucidar e racionalizar sua aplicabilidade ao campo objeto de interesse. Trata-se, portanto, de proposição orientativa geral, cujas disposições devem ser ponderadas caso a caso, ou seja, com base no caso concreto, levando-se em consideração as características e propósito do produto no contexto de utilização clínica prevista. Ademais, por se tratar de área do conhecimento ainda em processo de construção e consolidação, essa poderá sofrer alterações ao longo do tempo, o que poderá requerer do leitor atenção e busca ativa por atualizações.

5.1 NANOTECNOLOGIA APLICADA A MATERIAIS DE USO EM SAÚDE

Materiais de uso em saúde constituem por si só um conjunto de produtos diversos, reconhecidos por suas diferentes características, finalidades e níveis de complexidade. Realidade que se repete no âmbito da Nanomedicina, que dentre outras categorias de produtos, abarca dispositivos médicos de finalidade preventiva ou terapêutica, vertente em que se inserem os materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, apresentados sob uma grande diversidade de formas, características, propósitos de uso e possibilidades de aplicação.

Conforme disposto pela norma ISO/TR 10993-22 (2017a), no contexto de dispositivos médicos, os nanomateriais podem se apresentar de forma livre, fixa ou incorporados a uma

matriz, como material nanoestruturado ou como estruturas de superfície em materiais ou no próprio dispositivo (ISO, 2017a). No âmbito das aplicações biomédicas, nanomateriais compósitos, metálicos, cerâmicos, poliméricos (SAJI; CHOE; YEUNG, 2010), nanotubos de carbono e superfícies nanoestruturadas são comumente utilizados – sendo sua estrutura de superfície (composição química e topografia física), associada a propriedades de molhabilidade e energia livre, bem como aos seus efeitos toxicológicos, determinantes a sua aplicação final específica (RAMOS et al., 2017).

Dentre as aplicações mais comumente observadas no âmbito dos materiais de uso em saúde, destacam-se os nano-recobrimentos e/ou modificações [topográficas e funcionais] de superfície, enquanto estratégias para melhoria da resposta biológica (GEERTSMA et al., 2015) em termos de biocompatibilidade e biomimetização – por meio de processos como a osseointegração (em implantes dentários e ortopédicos recobertos com nanomateriais cerâmicos, como a hidroxiapatita, por exemplo, ou que tenham sua superfície modificada por nano-rugosidades, ou que se utilizem de nanocristais de hidroxiapatita para mimetização da composição e microestrutura óssea naturais); bem como de adesão, crescimento e proliferação celular pelo uso de matrizes de substituição dérmica e *scaffolds* (suporte) nanoestruturados, utilizados para regeneração tecidual (constituídos por nanofibras que mimetizam a matriz extracelular promovendo um microambiente adequado à proliferação celular). Uma outra aplicação relevante no âmbito dos nano-recobrimentos refere-se à utilização de nanopartículas com propriedades antimicrobianas, como as de prata, ouro, óxido de zinco, depositadas sobre a superfície de cateteres venosos ou incorporadas a curativos, têxteis médicos (gorros, aventais). Ademais, estratégias relacionadas ao incremento de propriedades mecânicas e de resistência (observadas nos nanopreenchedores de uso odontológico pelo uso de nanocompósitos, bem como em cateteres de paredes reforçadas por nanotubos de carbono para aumento de resistência e flexibilidade) e; ao desenvolvimento de sistemas de entrega controlada de fármacos em cateteres e stents farmacológicos (baseados em matrizes nanoporosas, nanocarreadores ou superfícies nanopadronizadas, nanoporosas) figuram como possibilidades de aplicação igualmente importantes no cenário de materiais de uso em saúde (AFSSAPS, 2011; AKÇAN et al., 2020; GEERTSMA et al., 2015; HALAMODA-KENZAOUI et al., 2019; ROSZEK; JONG; GEERTSMA, 2005).

Contudo, apesar do entusiasmo relacionado aos importantes avanços e inovações proporcionados pela Nanomedicina, muito se tem discutido sobre os potenciais impactos biológicos relacionados aos nanomateriais utilizados, que por suas propriedades físico-químicas únicas (tamanho diminuto, maior área de superfície específica, maior reatividade – apenas para

citar algumas) poderiam alcançar locais antes inacessíveis e interagir com elementos biológicos desencadeando eventos com potencial tóxico e deletério ao organismo – o que gera preocupação e, por conseguinte, requer uma abordagem mais cautelosa em relação à avaliação de segurança de produtos que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, não apenas pelo órgão regulador, mas principalmente pelo ente regulado, responsável pelo projeto, desenvolvimento e consecução do produto.

Dentre as principais preocupações de segurança relacionadas ao uso de nanomateriais em materiais de uso em saúde (em especial, os invasivos) destacam-se:

- seu potencial para interação biológica e interferência em processos biológicos importantes a nível celular e molecular, com repercussão direta sobre diversos desfechos toxicológicos relevantes, a depender da via de exposição e duração do contato;

- seu potencial para liberação de nanomateriais livres, nano-objetos gerados como subprodutos de degradação, corrosão (inclusive íons), desgaste (provocado pelo mecanismo de funcionamento do produto) ou resultantes a algum processamento fabril ou procedimento para uso;

- seu potencial para translocação, alcance de órgãos secundários, transposição de barreiras biológicas e desencadeamento de respostas sistêmicas (ou a sistemas específicos);

- potencial para formação de agregados/aglomerados por nanomateriais livres ou nano-objetos liberados com possível repercussão sobre o funcionamento de sistemas importantes à manutenção da vida;

- solubilidade e potencial para acumulação, enquanto perigo especialmente relacionado a nanomateriais insolúveis ou parcialmente solúveis, já que o nanomaterial ou seu residual poderão permanecer no organismo e nele se acumular, podendo inclusive deflagrar respostas deletérias de ordem aguda ou crônica. Situação não esperada para nanomateriais solúveis, já que uma vez dissolvidos, esses passariam a ser tratados da mesma forma que substâncias químicas convencionais [não isentas de preocupação, considerando-se as espécies dissolvidas e íons livres liberados] segundo Tantra et al. (2016).

Por isso, abordagem preventiva (*precautionary approach*), baseada em análise caso a caso, pautada por avaliação de risco sistemática e pormenorizada que leve em consideração aspectos relacionados à identificação e caracterização do nanomaterial incorporado ao produto acabado, aos possíveis cenários de exposição e potenciais perigos relacionados, a partir de testes de segurança biológica (*in vitro* e *in vivo*) definidos como necessários – deve ser adotada. Tal lógica encontra-se representada no Diagrama 1.

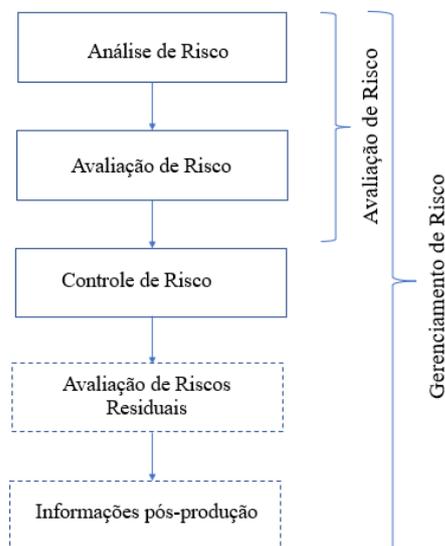
Diagrama 1- Representação do Processo de Avaliação de Riscos Biológicos relacionados a Materiais de Uso em Saúde que contenham nanomateriais



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Conforme definido pela norma ISO 10993-1, a avaliação de risco supramencionada seria o resultado da combinação dos processos de análise de risco (em que os riscos são identificados e estimados) e de sua avaliação (para determinação de sua aceitabilidade e eventual necessidade de medidas de mitigação/control), conforme representado no Fluxograma 2 (ISO, 2018a).

Fluxograma 2- Representação Esquemática do Processo de Gerenciamento de Risco previsto pela norma ISO 14971: 2019



Fonte: Adaptado de ISO (2018a).

Durante a análise de risco, perigos específicos são identificados e avaliados quanto a sua significância, para que assim possam ser estimados quanto ao seu risco (definido pela combinação entre probabilidade de ocorrência e nível de severidade). Para tanto, sendo esse processo inserido na avaliação de segurança biológica, variáveis relacionadas ao potencial de exposição do nanomaterial contido no produto ou dele liberado; às propriedades físico-químicas, morfológicas e topográficas por ele manifestadas (enquanto nanomaterial livre, despreendido ou gerado por processos de degradação/desgaste) e; ao seu potencial toxicológico – inclusive enquanto parte do produto acabado – devem ser consideradas.

Uma vez caracterizados, os riscos precisam ser avaliados quanto a sua aceitabilidade para que, caso necessário, medidas de controle possam ser implementadas, podendo essas resultarem em adequações de projeto e revisões de processos, inclusive relacionadas ao nanomaterial empregado, cujo uso apenas se justificaria num cenário favorável aos benefícios por ele proporcionados em relação aos seus potenciais riscos.

É importante ressaltar que, o processo de gerenciamento de risco previsto pela norma ISO 14971 é mais abrangente e completo, por contemplar aspectos outros, além daquele relacionado à segurança biológica – que constitui uma de suas vertentes.

5.1.1 Requisitos Essenciais de Segurança aplicáveis a Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, segundo a Resolução – RDC nº 546/2021

A Resolução de Diretoria de Colegiada – RDC nº 546/2021 estabelece os requisitos essenciais de segurança e eficácia aplicáveis a dispositivos médicos. Trata-se de regulamento geral e abrangente, cujas disposições aplicam-se a todo e qualquer dispositivo, independente da tecnologia ou características do material empregado – sendo, portanto, plenamente extensível ao contexto de materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, ou que incidentalmente os produzam.

Por abarcar sob seu escopo tanto requisitos de segurança como de eficácia, esses devem ter seu cumprimento atestado pela condução e apresentação de avaliações de natureza pré-clínica, relacionadas à funcionalidade e desempenho do produto, bem como a sua estabilidade e esterilidade, quando aplicável; e clínica, representada pela condução de estudos clínicos de natureza confirmatória, a depender do tipo e grau de inovação incorporada ao produto (em

termos de *design* e composição/constituição, finalidade e indicação de uso), para que as alegações atribuídas sejam devidamente comprovadas. Contudo, considerando-se que a abordagem deste trabalho encontra-se voltada à avaliação de segurança biológica, as diretrizes ora apresentadas se configurarão como um recorte da avaliação de segurança estabelecida pela Resolução RDC nº 546/2021 que, além de requisitos relacionados a potenciais riscos biológicos, também considera situações de risco advindas do projeto, processos de manufatura, estabilidade, esterilidade, mecanismo de funcionamento do produto, sua usabilidade, bem como de sua eficácia no contexto de utilização clínica proposta – demandando assim a realização de outros tipos de avaliações, que sejam capazes de evidenciar a segurança e eficácia do produto como um todo e em todo o seu ciclo de vida.

Nesses termos, dentre os requisitos previstos pela Resolução RDC nº 546/2021, aplicam-se à avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde que incorporem ou que contenham nanomateriais e/ou que gerem nano-objetos, sob uma perspectiva de risco:

- a concepção e fabricação de produtos que não comprometam o estado clínico e a segurança do paciente, quando utilizados sob as condições previstas, devendo os possíveis riscos existentes serem reduzidos a níveis aceitáveis em relação aos benefícios proporcionados;
- o gerenciamento responsável dos riscos pelo fabricante, com base nos princípios de eliminação ou redução dos riscos na medida do possível, adoção de medidas de proteção oportunas e disponibilização de informação sobre riscos residuais;
- a manutenção das características e desempenho do produto durante o período de validade [e/ou vida útil] estabelecido pelo fabricante e sob condições normais de uso;
- a seleção de materiais apropriados, particularmente, quanto a sua toxicidade; bem como à compatibilidade entre materiais e, entre esses e os tecidos biológicos, células e fluidos corporais;
- a minimização de riscos relacionados a contaminantes, resíduos e, de infecção – desde a concepção e processamento do produto [fase de projeto e fabricação] até a obtenção do produto acabado;
- a previsão, minimização e controle de possíveis interações do produto com materiais, substâncias e gases que com ele entrem em contato durante o seu uso e em procedimentos habituais; e
- a minimização de riscos que derivem de substâncias desprendidas do produto.

Conforme demonstrado, a segurança do paciente/usuário deve ser priorizada e assegurada, desde a concepção do projeto até a obtenção do produto acabado e utilização clínica

proposta, em um processo contínuo de análise, avaliação e controle de riscos – consolidado por ações que vão desde o projeto (que inclui *design* do produto, escolha de materiais seguros e compatíveis entre si, implementação de processos fabris apropriados) até a implementação de controles durante a fabricação e processamento do produto, com vistas à eliminação ou máxima redução dos riscos identificados, inclusive no que tange a contaminantes e eventual liberação/desprendimento de substâncias que possam deflagrar eventos nocivos ao organismo – condições passíveis de ocorrência no âmbito de materiais de uso em saúde de modo geral, e entre aqueles que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, motivo pelo qual diretrizes base direcionadas às particularidades do processo de caracterização físico-química de nanomateriais e avaliação de segurança biológica aplicável a essa categoria de produtos serão aqui apresentadas.

5.1.2 Caracterização físico-química e biológica do nanomaterial

Frente à possibilidade de materiais em nanoescala apresentarem propriedades físico-químicas distintas (em relação aos seus equivalentes convencionais em macroescala) com potencial impacto sobre seu comportamento biológico, inclusive no que tange ao desencadeamento de eventos toxicológicos adversos, sua identificação e caracterização mostram-se imperativas à avaliação de segurança biológica, enquanto etapas iniciais e indispensáveis à determinação e gerenciamento de riscos sob uma perspectiva de ciclo de vida do produto.

Nesse sentido, o processo de caracterização do nanomaterial deve ser “estagiado” e, por conseguinte considerado em, idealmente, três cenários, enquanto material sintético (em seu estado original); disperso em meio biológico relevante que mimetize o cenário de exposição esperado para determinação de sua identidade biológica (considerando a formação do complexo nanomaterial-biocorona, resultante às biotransformações sofridas pelo nanomaterial exposto ao meio biológico) e, se possível, como parte do produto no seu contexto de aplicação clínica (*in situ*), condição que requererá uma análise de variáveis relacionadas à via de exposição, forma de apresentação e finalidade do nanomaterial no produto, seu potencial desprendimento, liberação e translocação no organismo. O último cenário pode se mostrar inviável frente às metodologias e ferramentas ora disponíveis, motivo pelo qual poderá ser avaliado em momento posterior, a partir dos resultados obtidos nos processos de caracterização e avaliação de

segurança biológica (testes toxicológicos aplicáveis) do produto acabado que contenha o nanomaterial. A condução de uma caracterização físico-química completa constitui fator crítico ao planejamento da avaliação de segurança biológica sob uma perspectiva de risco.

Considerando-se a diversidade de propriedades físico-químicas apresentadas na seção Resultados e Discussão, bem como a completude da caracterização requerida – análise dos atributos aplicáveis ao caso concreto, com vistas à identificação de perigos relacionados deverá ser realizada pelo fabricante. Para tanto, sugere-se que os atributos dispostos pela norma ISO/TR 13014 sejam tomados como referência e ponto de partida, o que não exclui consulta e inclusão de outros atributos gerais considerados aplicáveis, e que estejam disponíveis em outras fontes tais como literatura, documentos e normas técnicas relacionadas ao nanomaterial objeto de interesse. Quanto aos atributos específicos, esses serão variáveis e poderão ser definidos com base na natureza do nanomaterial, sua finalidade, forma de aplicação no produto e seu potencial de exposição no organismo, bem como no *design*, forma de apresentação, nível e tempo de contato no organismo e funcionalidade do produto acabado – amparados por conhecimentos disponíveis em literatura relacionada e normas técnicas aplicáveis.

Indubitavelmente, atributo central a ser necessariamente considerado em qualquer processo de caracterização no âmbito de nanomateriais é o tamanho, que em termos normativos e regulatórios, tem sido, em geral, especificado dentro do intervalo dimensional convencionalmente estabelecido entre 1 e 100 nm. Considerando-se a definição que será adotada pelo novo regulamento nacional de dispositivos médicos (e aquela já instituída pelo regulamento europeu), é necessário que o número de partículas e a distribuição de tamanho também sejam considerados e mensurados, a fim de que todos os requisitos contemplados na definição sejam evidenciados.

Quanto à possibilidade de enquadramento de materiais que ultrapassem o marco superior de 100 nm até o limite de 1000 nm, como nanomateriais, essa apenas se configurará frente à demonstração de que propriedades tamanho-dependentes distintas e não observáveis no mesmo material em macroescala estejam presentes, agregando ao produto no qual estariam contidos melhorias e/ou diferenciais relacionados a sua segurança ou desempenho.

Em relação a outros atributos físico-químicos gerais importantes, a serem considerados no processo de identificação e caracterização do nanomaterial citam-se: forma da partícula (dimensão e relação de aspecto), área de superfície específica, densidade, composição química (núcleo, superfície, geral), propriedades de superfície (carga, recobrimento, afinidade), cristalinidade/defeitos, pureza/impurezas/presença de contaminantes (inclusive biológicos),

solubilidade/dispersabilidade, estados de agregação/aglomeração (KARAKUS; BILGI; WINKLER, 2020; ISO, 2011) – alguns deles representados pela Figura 5.

Figura 5 - Representação de algumas propriedades físico-químicas importantes à aplicação biomédica de nanomateriais



Fonte: Adaptado de (NAVYA; DAIMA, 2016).

No que tange aos atributos específicos, sua definição guarda estreita correlação com fatores relacionados à aplicação e finalidade do nanomaterial no produto, via de exposição, uso pretendido e sua forma de apresentação no produto, devendo, portanto, serem considerados por meio de avaliação caso a caso. Dentre eles citam-se: características de superfície (modificações de superfície por meio de funcionalização, estratégias de recobrimento, encapsulamento para mitigar a toxicidade, por exemplo), atividade catalítica ou fotocatalítica, pH, características de estrutura e topografia – aplicáveis a superfícies nanoestruturadas (tal como a rugosidade) e, aquelas relacionadas a estruturas/superfícies nanoporosas (tais como tamanho, estrutura, densidade e distribuição de poros), taxa de dissolução, taxa de degradação, corrosividade.

Sobre a caracterização de nanomateriais, faz-se oportuno ressaltar que esta, diferentemente das caracterizações em geral realizadas para análise de materiais fora da nanoescala (que priorizam atributos essencialmente químicos) – privilegia igualmente a análise de atributos físicos e químicos (incluindo suas impurezas), já que ambos exercem importante influência sobre o comportamento cinético, as interações biológicas e os eventos toxicológicos deflagrados por essas entidades no organismo humano, além de também lhes conferir propriedades únicas concebíveis em uma ampla gama de possíveis aplicações.

Ademais, considerando-se que alterações mínimas em quaisquer das características de um dado nanomaterial podem resultar em mudanças substanciais de suas propriedades (ISO, 2011) o processo de caracterização físico-química requerido para fins regulatórios deve ser realizado no material especificado para uso no produto, conforme estabelecido em projeto, uma

vez que a partir dessa avaliação a identidade (sintética e biológica) do nanomaterial será determinada e o plano de avaliação de segurança biológica, sob uma perspectiva de gerenciamento de risco, estruturado. Nesse contexto, avaliações baseadas em similaridade, obtidas a partir de nanomaterial diferente (com algum grau de similitude declarada com aquele que será utilizado no produto) podem ser temerárias, sendo por isso, desencorajadas, já que, atualmente, não há sistemas suficientemente sólidos, devidamente validados, e que sejam aceitos no âmbito regulatório, para triagem ou agrupamento de materiais com características semelhantes, e que, portanto, viabilizem extrapolações confiáveis.

Corroborar esse entendimento, disposição constante no texto da norma ISO /TR 10993-22, a respeito da equivalência de nanomateriais, que por sua natureza, dependeria de múltiplos fatores, e não apenas da composição para ser estabelecida, já que outras propriedades nano-específicas poderiam ser influenciadas por outros aspectos, inclusive externos, capazes de impactar a identidade e o comportamento do nanomaterial. Do mesmo modo, a extrapolação de resultados provenientes de outros produtos que utilizem ou contenham nanomaterial similar ou de composto parental correspondente da mesma substância (pertencente à mesma família química) – não é, em geral, aplicável (ISO, 2017a). Portanto, o conceito de equivalência apenas deve ser alegado, se apropriadamente demonstrado e justificado por dados – o que não se constitui tarefa fácil (AFSSAPS, 2011).

Outro ponto importante a ser mencionado no contexto de caracterização refere-se à variedade de metodologias analíticas disponíveis e suas limitações para determinação dos atributos definidos – condição que reforça a necessidade de justificativa para escolha de cada um dos métodos, bem como das associações propostas entre eles, visto que em geral, mais de uma metodologia é ou precisa ser utilizada – seja para conferir maior confiabilidade às mensurações realizadas, seja para racionalizar recursos pelo processamento de avaliações em simultâneo de mais de um atributo.

É importante considerar a adequabilidade dos métodos disponíveis ao tipo de nanomaterial e sua apresentação, ao atributo a ser avaliado e às condições requeridas para análise.

No Quadro 8 são apresentados alguns dos principais atributos de interesse e respectivos métodos analíticos aplicáveis, nos termos do disposto pelas normas técnicas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a).

Quadro 8 – Relação de Metodologias Analíticas Aplicáveis à mensuração das principais características físico-químicas, segundo as normas ISO/TR 13014 (2012) e ISO/TR 10993-22 (2017a) (previamente apresentado no subcapítulo Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração da Seção Resultados e Discussão)

Características físico-químicas	Metodologias aplicáveis
Tamanho de Partícula e Distribuição de Tamanho de Partículas	Espalhamento dinâmico de luz (<i>Dynamic Light Scattering – DLS</i>); Cromatografia por exclusão de tamanho; Microscopia eletrônica de varredura (MEV); Microscopia eletrônica de transmissão (MET); Microscopia de sonda de varredura (MSV); Espectroscopia de Raman; Microscopia Confocal; ...
Estado de Agregação/Aglomerção	Difração por raio-X; Espalhamento dependente de ângulo em diferentes comprimentos de onda; Espalhamento de raios-x de pequeno ângulo; Dispersão de luz estática; Difração de laser; Microscopia eletrônica de transmissão (MET); ...
Morfologia (forma física e estrutura cristalina)	Microscopia eletrônica de varredura (MEV); Microscopia eletrônica de transmissão (TEM); Microscopia de Força Atômica (MFA); Microscopia de sonda de varredura; Técnicas de Escaneamento; ...
Área de Superfície	Métodos baseados em isotermas de adsorção de gás ou líquido [Brunauer-Emmett-Teller (BET) Theory]; Incandescência induzida por laser; ...
Composição Química e Pureza	Fluorescência de raio-X; Espectroscopia fotoeletrônica de raio X; Difração por raios X de Fourier; Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy – FTIR), Espectroscopia Raman e outras espectroscopias de moleculares; Análise de pureza Termogravimétrica; Microscopia eletrônica de varredura (MEV); Ressonância Nuclear Magnética; ...
Química de Superfície	Espectroscopia de elétrons Auger; Espectroscopia fotoeletrônica de raio-X; Espectroscopia de íons de baixa energia; Raman e outras espectroscopias moleculares; Tomografia de sonda atômica 3D; Espectrometria de raios-X dispersiva de energia; ...
Carga de Superfície	Ponto isoelétrico; Espalhamento eletroforético de luz; Eletroforese; ...
Solubilidade/Dispersabilidade	Não existem métodos específicos para avaliação da solubilidade de nano-objetos. Contudo, pode-se reportar a diálise de equilíbrio, espectroscopia de emissão de massa por plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Mass</i>

	<p><i>Spectrometry – ICP-MS</i>) ou espectroscopia de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry – ICP-OES</i>) como possíveis métodos de mensuração.</p> <p>Filtração de fluxo tangencial para separação de nanomateriais seguida por detecção apropriada.</p> <p>Métodos para avaliar dispersabilidade de nano-objetos são baseados no tamanho de partícula/distribuição de tamanho e estados de agregação/aglomeração.</p>
Nanoestruturas de Superfície	<p>Interferometria;</p> <p>Reflectometria;</p> <p>Microscopia de sonda de varredura (MSV);</p> <p>Microscopia de força atômica (MFA);</p> <p>Microscopia de varredura por tunelamento (MVT);</p> <p>...</p>

Fonte: Adaptado de ISO (2012) e ISO (2017a).

Frente à inviabilidade de condução de algum ensaio pela indisponibilidade ou inadequabilidade de algum método analítico à avaliação de atributo definido como necessário ou sob as condições requeridas – é desejável que justificativa técnica e cientificamente embasada, inclusive no que tange à necessidade de avaliações complementares para identificação, mitigação ou controle de eventuais perigos ou mesmo riscos relacionados, seja elaborada e apresentada.

Cumprir pontuar que certificado emitido pelo fornecedor do nanomaterial a ser utilizado no produto, a respeito de suas especificações técnicas, não se constitui como documento comprobatório para fins regulatórios, tanto pela necessidade de verificação independente – conforme ponderado por Stone; Johnston; Schins (2009) [em termos de conformidade e mesmo aceitabilidade]; como pelo fato de o processo de caracterização requerido, enquanto parte do processo de avaliação de segurança biológica, ser mais abrangente e detalhado, já que deve contemplar não só a identidade sintética do nanomaterial, mas também a biológica, sob condições relevantes e que mimetizem a exposição esperada.

Ademais, outros fatores críticos nesse cenário de caracterização que não podem ser desconsiderados relacionam-se: ao preparo da amostra, a ser preferencialmente realizado conforme protocolo reconhecido, devidamente identificado e descrito no relatório do ensaio relacionado; à possibilidade de interferência causada por variáveis confundidoras, que devem ser identificadas, descritas e sempre que possível minimizadas, para que a interpretação dos resultados não seja comprometida; e à variabilidade lote a lote que deve ser considerada e minimizada pela adoção de boas práticas de fabricação pelo fornecedor e fabricante, cabendo ao último estabelecer critérios para avaliação do fornecedor, especificando requisitos, inclusive de qualidade que deverão ser satisfeitos.

Por oportuno, outro aspecto importante a ser considerado no contexto de caracterização de nanomateriais utilizados no âmbito da saúde, refere-se à avaliação de seu potencial tóxico, realizada por meio de alguns testes de triagem toxicológica, com vistas à compreensão das nanobiointerações e de possíveis repercussões adversas deflagradas por propriedades nano-específicas. Dentre os testes comumente realizados nessa etapa, dita de “caracterização biológica”, destacam-se aqueles relacionados à avaliação de viabilidade celular – expressa por diferentes mecanismos e, por conseguinte, identificada por diferentes métodos de teste de citotoxicidade; de genotoxicidade – também manifestada por diferentes desfechos, sendo por isso analisada por mais de um teste; de indução de estresse oxidativo; resposta inflamatória e imunológica; bem como de contaminação por endotoxinas.

Além desses, testes mais específicos e relacionados ao cenário de exposição do nanomaterial a ser utilizado encontram-se previstos e descritos na norma ISO/TR 16197 (2014a), que dentre outros ensaios dispõe sobre testes de hemocompatibilidade, testes para avaliação de transposição a barreiras biológicas e sistemas específicos, teste toxicocinético – cuja pertinência deve ser ponderada conforme aplicação e exposição prevista para o nanomaterial objeto de interesse.

Com vistas a uma maior confiabilidade e mesmo reprodutibilidade dos dados obtidos a partir dessas avaliações, recomenda-se que metodologias validadas (próprias ou adaptadas para análise de nanomateriais, tais como aquelas disponíveis no âmbito da OCDE, ISO e ASTM) sejam adotadas, haja vista ser essa uma limitação importante no campo da nanotoxicologia, ainda marcado por publicações de qualidade metodológica variável, protocolos experimentais pouco detalhados, e apresentação de resultados contraditórios que inviabilizam comparações, comprometendo assim a compreensão de fenômenos, sua transposição para cenários fisiológicos reais, bem como sua aceitabilidade para fins regulatórios, e mesmo aproveitamento dos dados gerados para melhoria e avanço de metodologias preditivas.

Ademais, a adoção de instrumentos que direcionem o “registro padrão” de informações relevantes e com o nível de detalhamento necessário à demonstração do percurso metodológico seguido para obtenção de dados qualificados, confiáveis e significativos também contribui para o avanço e consolidação desse processo de padronização. Para esse contexto de caracterização e experimentação em nanobiointerações, a estrutura MIRIBEL (*Minimum Information Reporting in Bio-Nano Experimental Literature*)²⁶, proposta por Faria et al. (2018), e baseada nos pilares da caracterização material, da caracterização biológica e no detalhamento de

²⁶ Tradução nossa: Relato de Informações Mínimas em Literatura Bio-Nano Experimental (MIRIBEL).

protocolos experimentais – mostra-se como uma referência amigável à elaboração de relatos mais completos e úteis, não apenas à comunidade científica, mas a outros atores envolvidos e interessados na geração, troca e melhor aproveitamento de dados qualificados para fins diversos – tal como representado e resumido pela Figura 6.

Figura 6 - Representação dos componentes MIRIBEL e destaque a alguns aspectos relevantes considerados no relato de processos de caracterização e experimentação em nanobiointeração

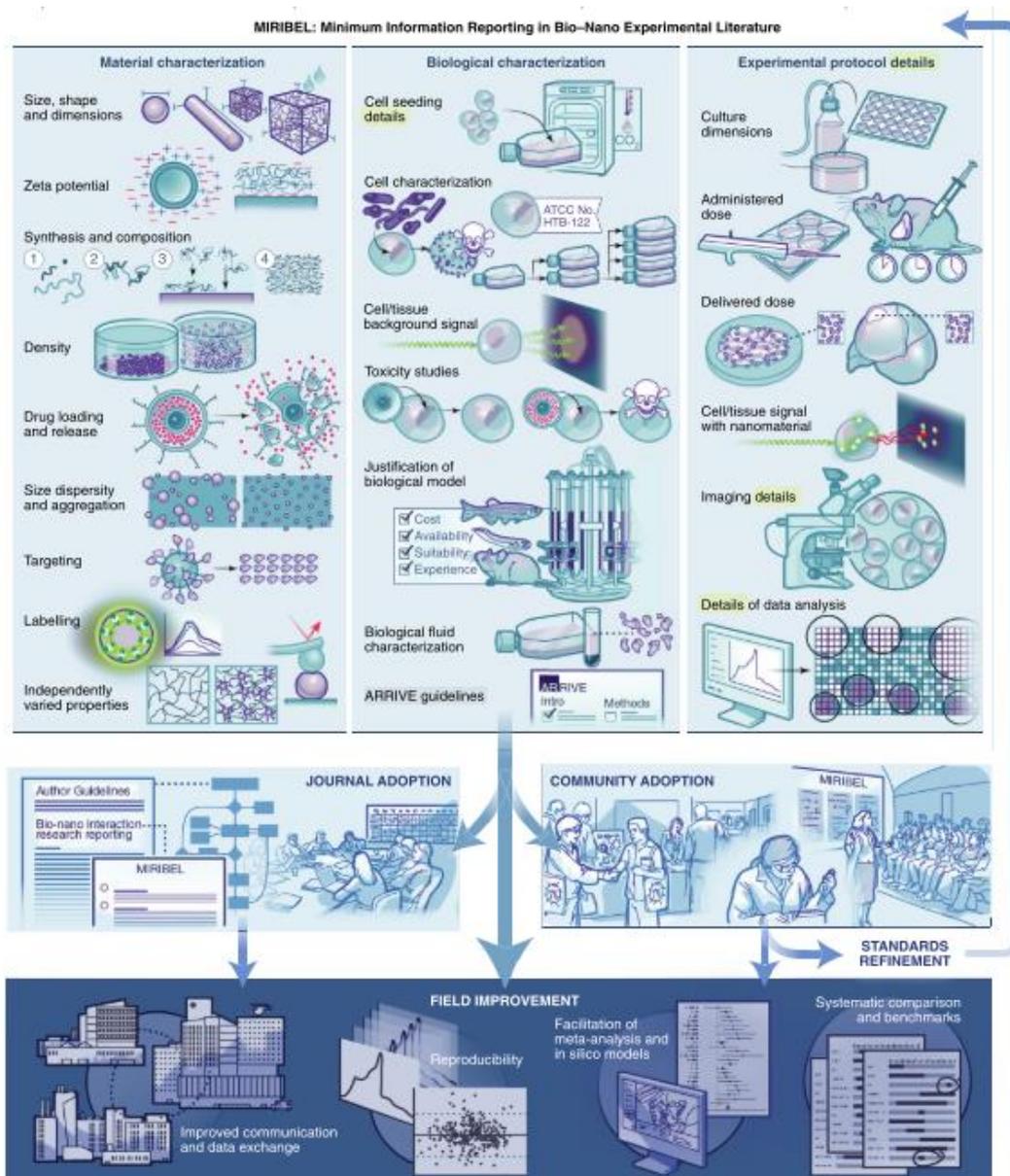


Fig. 1 | Summary of MIRIBEL components, guiding principles and potential benefits. The development of MIRIBEL was guided by principles of reusability, quantification, practicality and quality. If combined with journal and community adoption, MIRIBEL can lead to improved outcomes in the field, including data exchange and communication, reproducibility, deeper analysis of published data, and systematic comparison between approaches and materials.

Fonte: FARIA et al. (2018).

Cumpra enfatizar que, apesar de não se constituir como ferramenta de finalidade regulatória, a estrutura MIRIBEL pode ser utilizada como referência à elaboração de relatórios de ensaio/teste melhor detalhados, em relação não apenas à amostra teste avaliada, mas ao modelo de teste utilizado (se *in vitro* – tipo celular e de cultura, sua representatividade ou *in vivo* – justificativa à escolha do modelo animal, caso aplicável), à metodologia empregada (identificação de sua versão (caso adaptada) e referência utilizada, condições de preparo/processamento da amostra, bem como de exposição – identificação e características do meio de cultura ou fluido biológico empregado, dose administrada e entregue, material de referência, uso de controles positivo e negativo, adoção de medidas para minimização de interferências e literatura ou referência de suporte), análise e interpretação de resultados (*software* utilizado e discussão dos achados à luz da literatura relacionada), limitações do estudo – informações que conforme evidenciado não só englobam, como extrapolam aquelas consideradas pelo modelo referenciado e acima representado, haja vista o grande número de fatores que podem impactar a condução e resultados fornecidos pelos ensaios de caracterização e experimentação.

Por todo o exposto, pode-se dizer que a avaliação de efeitos danosos causados por nanomateriais requer a compreensão do todo, que envolve desde os procedimentos de síntese e métodos para caracterização do material, até uma apreciação detalhada do impacto do nanomaterial nos processos biológicos e fisiológicos (SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010).

5.1.3 Avaliação de Segurança Biológica sob uma Perspectiva de Risco

Conforme asseverado pela norma ISO 10993-1, a avaliação de segurança biológica é uma atividade de verificação de projeto, que é definida no contexto de processos de gerenciamento de risco mais amplos (ISO, 2018a).

Em assim sendo, quando aplicada a materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais deve considerar, além de fatores como via de exposição, frequência e tempo de contato do produto no organismo, o tipo de nanomaterial empregado e como esse compõe o produto do qual faz parte (se livre, fixo sob a forma de recobrimento ou incorporado a uma matriz) e nele se comporta quando exposto a condições fisiológicas esperadas (se sofre processos de degradação ou corrosão que o exponha a interação ou leve à

liberação de subprodutos tóxicos ou mesmo de nano-objetos) – de modo a viabilizar, segundo a norma ISO 10993-1 a identificação de perigos, a estimativa de riscos biológicos associados e, por conseguinte, a determinação de sua aceitabilidade, à luz da norma ISO 14971 (ISO, 2019a).

Etapas anteriores relacionadas ao projeto do produto (*design*, composição, funcionamento) e processos empregados para sua obtenção (manufatura, limpeza, embalagem, esterilização, processos de controles) também devem ser considerados e contemplados no processo de gerenciamento de risco, frente ao seu potencial impacto sobre a segurança (inclusive biológica) do produto.

Logo, informações relacionadas a todo o ciclo de vida do produto, desde a sua concepção até sua obtenção como produto acabado, inclusive no que tange a sua aplicação, funcionamento e descarte (informações pós-produção), são necessárias a uma avaliação de risco compreensiva, que no contexto das Diretrizes propostas, terá seu enfoque direcionado à avaliação de riscos biológicos relacionados à presença de nanomateriais em materiais de uso em saúde (enquanto produtos acabados) – sob a forma de materiais livres, fixos como recobrimentos, incorporados (como materiais nanoestruturados), enquanto superfícies nanoestruturadas e/ou produzidos e liberados como nano-objetos incidentais de produtos constituídos ou não por nanomateriais.

Para tanto, abordagem do tipo caso a caso, estruturada a partir do planejamento e condução de testes de segurança biológica baseados em métodos de teste *in vitro* e *in vivo*, permanece como modelo recomendado para avaliação desse tipo de produto – seja pela alta especificidade de suas características, seja pela baixa qualidade metodológica dos dados nanotoxicológicos disponíveis e sua difícil extrapolação para cenários de exposição e utilização clínica diversos, seja pela indisponibilidade de modelos preditivos robustos, suficientemente validados e aceitos para fins regulatórios que viabilizem avaliações por similaridade.

Cumprando ressaltar que, em observância ao princípio dos 3Rs (*replacement, refinement and reduction*), métodos de teste alternativos ao uso de animais devem ser priorizados e adotados sempre que disponíveis e devidamente validados para avaliação de nanomateriais utilizados em ou liberados de dispositivos médicos (ISO, 2017a).

De modo geral, para determinação dos testes necessários à avaliação de segurança biológica de dispositivos médicos, incluindo-se materiais de uso em saúde que contenham ou sejam constituído por nanomateriais ou que gerem e liberem nano-objetos, devem ser considerados os seguintes aspectos:

- as propriedades físico-químicas do nanomaterial empregado, sua disposição no produto (livre, incorporado ou fixo a uma matriz), seu potencial para interação e/ou liberação para o meio;
- os resultados dos testes de triagem toxicológica do nanomaterial a ser utilizado;
- a natureza das matérias-primas empregadas e potenciais alterações *in situ* observadas ao longo do ciclo de vida do produto (bioabsorção/degradação/corrosão);
- as características topográficas, morfológicas e físico-químicas do produto final;
- a finalidade/uso pretendido do dispositivo;
- a natureza (nível de invasividade) e a duração de contato do produto no organismo;
- as condições de exposição a que o produto ficará submetido, sob condições de utilização clínica prevista.

Assim, considerando-se os aspectos supramencionados em conjunção com as disposições constantes na norma ISO 10993-1, relacionadas à categorização de dispositivos médicos quanto ao seu nível de invasividade (não-invasivos e invasivos: por estabelecerem contato com as superfícies dérmica e mucosa em estado íntegro ou comprometido; enquanto dispositivos de comunicação externa que entrem em contato direto com tecidos/ossos/dentina e circulação sanguínea, e indireto por acesso à via endovenosa; ou como dispositivos implantáveis) e à duração de contato (exposição limitada – até 24h; exposição prolongada – por até 30 dias; ou exposição de longo prazo – por mais de 30 dias) – tem-se a base para identificação dos desfechos de interesse e planejamento da avaliação de segurança biológica do material de uso em saúde que contenha ou seja constituído por nanomaterial, conforme o Quadro 9 abaixo apresentado.

Quadro 9 - Quadro-Resumo de Desfechos Biológicos previstos pela norma ISO 10993-1 (2018a) a serem considerados na Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais sob uma Perspectiva de Gerenciamento de Risco (previamente apresentado no subcapítulo Avaliação de Segurança Biológica da Seção Resultados e Discussão)

Categorias de dispositivos			Desfechos biológicos passíveis de avaliação nos termos da norma ISO 10993-1																		
Contato com o corpo humano	Duração do contato	Caracterização físico-química, morfológica e/ou topográfica – conforme aplicável	Lixiviáveis e Extráveis	Citotoxicidade	Sensibilização cutânea	Irritação ou Reatividade intracutânea	Pirogenicidade (material medido e por contaminantes)	Estudo de toxicocinética (ADME)	Toxicidade sistêmica aguda (24h)	Toxicidade sistêmica subaguda (24h a 28 dias)	Toxicidade sistêmica subcrônica (90 dias)	Toxicidade sistêmica crônica (6 a 12 meses)	Toxicidade específica (reprodutivo/desenvolvimento, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, etc)	Imunotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade	Genotoxicidade	Carcinogenicidade	Degradação		
			Dispositivo médico de superfície	Pele íntegra	Limitado	✘	●	●	●												
Prolongado	✘	●			●	●															
Permanente	✘	●			●	●															
Membrana mucosa	Limitado	✘		●	●	●															
	Prolongado	✘		●	●	●			●	●					●						
	Permanente	✘		●	●	●			●	●	●	●			●		●				
Superfície comprometida ou lesada	Limitado	✘		●	●	●	●		●												
	Prolongado	✘		●	●	●	●		●	●				▲	●					●	
	Permanente	✘		●	●	●	●		▲	●	●	●	●		▲	●		●	●	●	●
Dispositivo médico de comunicação externa	Contato indireto com a circulação sanguínea	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●				▲	●				●	
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	●	●
	Contato com tecido/osso/dentina	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●				▲	●		●			●
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●		▲	●		●	●	●	●
	Circulação sanguínea	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●			▲	▲	●	●	●	●		●
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	▲	▲	●	●	●	●	●	●
Dispositivo médico implantável	Tecidos/Ossos	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●			▲	▲	●		●		●	
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	▲	▲	●		●	●	●	●
	Sangue	Limitado	✘	●	●	●	●		●												
		Prolongado	✘	●	●	●	●		▲	●	●			▲	▲	●	●	●	●		●
		Permanente	✘	●	●	●	●		▲	●	●	●	●	▲	▲	●	●	●	●	●	●

Legenda:

- ✘ Pré-requisito necessário a uma avaliação de risco no âmbito da norma técnica ISO 10993-1:2018.
- Testes previstos na norma ISO 10993-1 aplicáveis a dispositivos médicos, de modo geral – passíveis ou não de condução conforme caso concreto.
- ▲ Testes a considerar, especialmente, no contexto de dispositivo médico que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais, ou que gerem e liberem nano-objetos.
- ▲ Testes a considerar, conforme achados do estudo de toxicocinética.

Fonte: Adaptado de ISO (2018a).

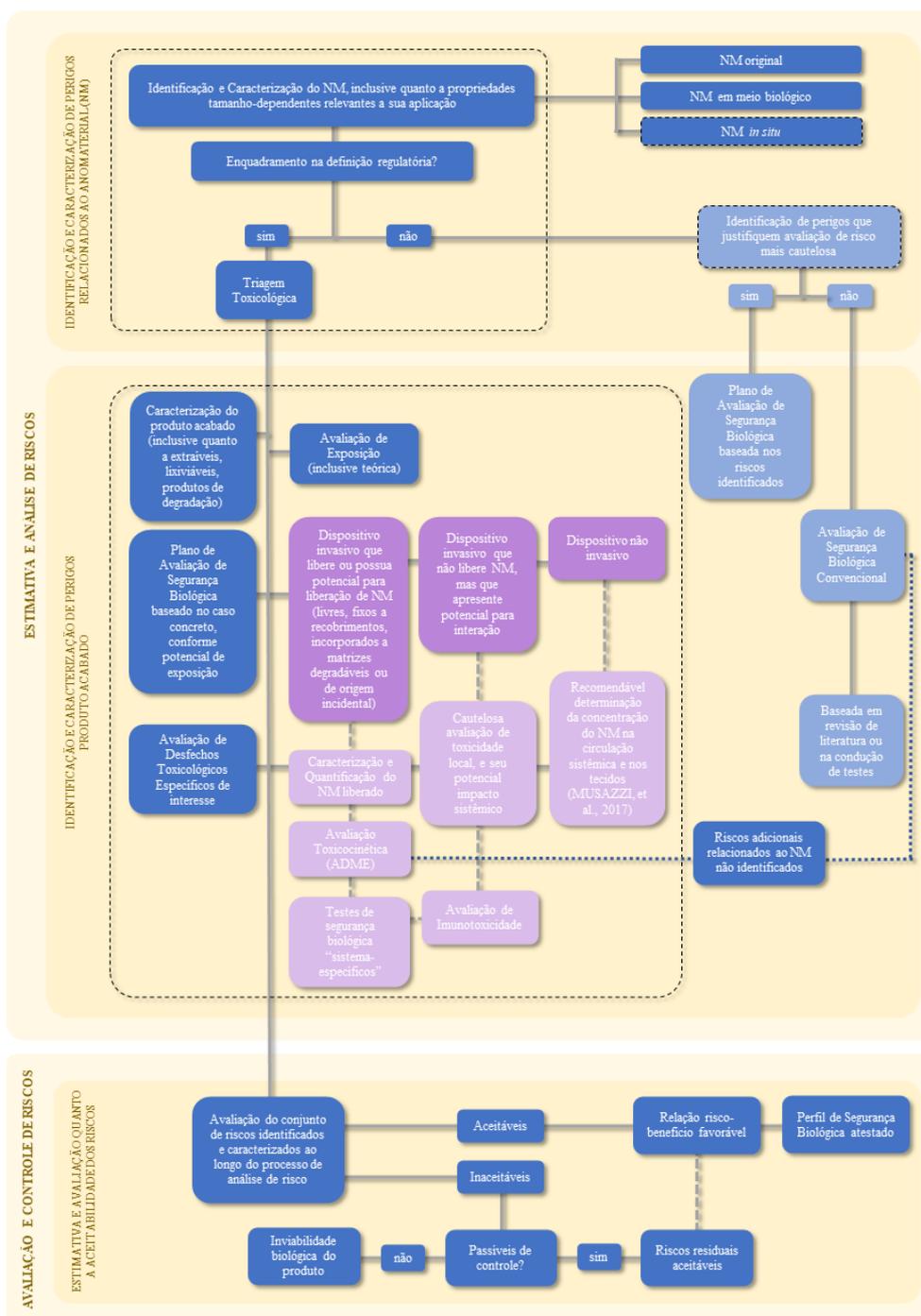
Portanto, além das informações físico-químicas e toxicológicas referentes ao nanomaterial que irá compor o material de uso em saúde, este (enquanto produto acabado) também deve ser avaliado quanto aos seus potenciais riscos biológicos, motivo pelo qual não apenas testes de caracterização (físico-química, morfológica e/ou topográfica, bem como de nano-objetos potencialmente liberados) e de toxicidade comumente previstos pela norma técnica ISO 10993-1 (conforme categorização do produto) devem ser realizados. Isso porque, a depender da composição/constituição do produto, dos processos de manufatura empregados, da forma de integração e de apresentação do nanomaterial no produto final – outros testes poderão ser requeridos para identificação de riscos relacionados a processos de degradação, ao desprendimento e liberação de nanomateriais livres ou incorporados a uma matriz degradável, a sua circulação, possível transposição de barreiras biológicas e interação com sistemas específicos, bioacumulação e deflagração de respostas inflamatória e imunológica, com possíveis desdobramentos toxicológicos de longo prazo.

Nesses termos, testes de degradação e toxicocinética podem compor a estratégia (inicial) de testes de avaliação de segurança biológica a ser implementada no caso concreto. Especificamente no que tange à avaliação toxicocinética, essa pode apontar para a necessidade de condução de outros ensaios mais específicos, tais como os de imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva e/ou desenvolvimental, neurotoxicidade, toxicidade crônica (caso evidenciado risco de acumulação, para avaliação de efeitos de longo prazo) a depender dos achados observados.

Por outro lado, esses mesmos achados também podem sinalizar para a não identificação de riscos adicionais relacionados ao nanomaterial associado (neste caso incorporado ou fixo a uma matriz não degradável, sendo seu potencial de exposição interna considerado negligenciável) ou ao próprio material de uso em saúde (cuja aplicação não resulte na liberação de nano-objetos) – condição que leva à possibilidade de condução dos demais testes de avaliação de segurança biológica sob bases convencionais, inclusive a partir de dados provenientes da literatura, que sejam capazes de evidenciar a segurança do produto com base no conhecimento corrente aplicável (até mesmo no que tange à tecnologia de incorporação do nanomaterial, sua estabilidade e permanência no produto) e/ou por meio da condução dos testes previstos pela norma, segundo a categorização aplicável ao produto – para que em conjunto com os achados preliminares anteriormente considerados (caracterização do nanomaterial e testes de triagem nanotoxicológica) seja possível demonstrar a segurança biológica do produto acabado.

A representação de todo esse processo de avaliação de segurança biológica descrito até aqui encontra-se resumida no Fluxograma 3, elaborado com o intuito de racionalizar e auxiliar o planejamento da estratégia de testes para avaliação de riscos biológicos de materiais de uso em saúde que contenham, sejam constituídos ou que produzam nanomateriais.

Fluxograma 3 - Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde que contenham, sejam constituídos ou gerem nanomateriais ou nano-objetos, sob uma perspectiva de Gerenciamento de Risco



NM = nanomaterial

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Em relação aos testes referenciados no Quadro-Resumo anteriormente apresentado, faz-se oportuno pontuar algumas considerações relevantes a respeito de cada um deles, nesse contexto de análise de materiais de uso em saúde que contenham, sejam constituídos ou que liberem nanomateriais, conforme disposto no **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Quadro 10 - Especificidades aplicáveis à avaliação de Materiais de Uso em Saúde que contenham, incorporem ou liberem nanomateriais

	Desfechos	Testes	Observações
1.	Citotoxicidade (morte celular, inibição do crescimento celular, formação de colônias, e outros efeitos celulares – disfunção metabólica, resposta inflamatória...)	Metodologias diversas aplicáveis a materiais convencionais, mas também utilizadas para avaliação de nanomaterial dentre as quais citam-se os ensaios de formação de colônia, MTT, XTT, MTS adaptado (previsto pela norma ISO 19007 (2018b), dedicada à mensuração de efeito citotóxico deflagrado por nanopartículas)...	- Recomendada a combinação de pelo menos dois métodos de ensaio diferentes (que avaliem desfechos distintos) para uma interpretação cientificamente válida ((AFSSAPS, 2011) MONTEIRO-RIVIERA et al., 2009). - Condição justificada pela possível interferência causada por nanomateriais na leitura de resultados colorimétricos e fluorométrico devido a propriedades de absorvância fotométrica e fluorescência intrínsecas, bem como por sua alta reatividade e potencial ligação a agentes corantes (AFSSAPS, 2011) e (ISO, 2017a). - Atenção à escolha do teste, do tipo/modelo celular e às características do nanomaterial mostra-se fundamental a avaliações mais assertivas (ISO, 2017a).
2.	Sensibilização	O Teste de Maximização em Porquinhos-da-Índia é o único recomendado para o contexto de análise que envolva nanomateriais (<i>Guinea Pig Maximization test – GPMT</i>).	- Método mais relevante para detecção de possível atividade de sensibilização por nanomaterial (aplicação intradérmica). - Identifica risco de hipersensibilidade tardia apenas. - Por serem aplicados em pele íntegra, o ensaio de linfonodo local (LLNA) e o teste em porquinhos-da-Índia Buehler são inadequados para avaliação de nanomateriais, que para ter seu potencial de sensibilização avaliado precisam penetrar na pele (GEERTSMA et al., 2015).
3.	Irritação/Reatividade Cutânea	a) Teste de Irritação dérmica (aplicação tópica); b) Teste de Reatividade Cutânea (aplicação intradérmica).	a) Aplicável a produtos em contato com a derme/epiderme ou mucosa; b) Avalia reação localizada do tecido exposto ao nanomaterial/dispositivo. - Aplicável a produtos implantáveis ou que entrem em contato com o sangue, sendo também útil à avaliação de NM hidrofóbicos.
4.	Pirogenicidade (material mediada e/ou mediada por pirógenos biológicos)	Teste de Lisado de Amebócito <i>Limulus</i> (<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>)	- Avaliação importante já que mesmo a esterilização terminal não inativa endotoxinas bacterianas, facilmente adsorvidas à superfície de nanomateriais;

		<p>– LAL), específico para endotoxinas bacterianas;</p> <p>Teste de Monócito Ativado (<i>Monocyte Activation Test</i> – MAT), destinado à detecção de outros pirógenos (leveduras, parasitas, vírus);</p> <p>Teste de pirogenicidade em coelho (<i>in vivo</i>), destinado à detecção (indiscriminada) de reações pirogênicas material mediadas.</p>	<p>- A presença de endotoxinas na superfície do nanomaterial pode atuar como variável confundidora, por interferir na interação entre nanomaterial e sistemas biológicos, e assim levar a conclusões incorretas sobre a biocompatibilidade do nanomaterial (ISO, 2017a).</p> <p>- Nenhum teste é capaz de diferenciar reações pirogênicas mediadas por material daquelas devido à contaminação por endotoxinas. A pirogenicidade mediada por material é rara, tendo essa sido observada em dispositivos médicos que contêm derivados de materiais biológicos (ISO, 2018a).</p>
5.	Toxicidade Sistêmica	<p>Testes de toxicidade sistêmica – aguda (24h), subaguda (24h a 28 dias), subcrônica (90 dias) e crônica (6 a 12 meses), conforme a duração de contato do produto ou possibilidade de desencadeamento de eventos adversos no longo prazo.</p>	<p>- A seleção do órgão/tecido a ser submetido à análise histopatológica deve ser realizada caso a caso, com ênfase no sistema retículo-endotelial – especialmente, fígado e baço, por serem órgãos comumente afetados pela circulação de nanomateriais (AFSSAPS, 2011) e (ISO, 2017a).</p> <p>- A depender da rota de exposição e uso pretendido do produto – órgãos como rim, cérebro, medula óssea, dentre outros podem requer análise (AFSSAPS, 2011) e (ISO, 2017a).</p> <p>- Para produtos contendo nanomaterial recomenda-se que a análise realizada seja o mais completa possível, com avaliação de parâmetros clínicos, biológicos e anatomo-patológicos (AFSSAPS, 2011).</p> <p>- Parâmetro chave a ser considerado nesse tipo de avaliação é a solubilidade do nanomaterial – que se insolúvel pode resultar em sobrecarga, acúmulo sistêmico, e eventos adversos no longo prazo. (AFSSAPS, 2011) e (ISO, 2017a).</p>
6.	Genotoxicidade (mutações genéticas, mudanças na estrutura e número de cromossomos e outras toxicidades genéticas ou ao DNA).	<p>Abordagem baseada em bateria de testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (ISO, 2018a).</p> <p>São tidas como opções recomendadas para avaliação de Materiais de Uso em Saúde que contenham nanomaterial ou liberem nano-objetos por metodologia <i>in vitro</i>:</p> <p>- Teste de mutação gênica usando células de linfoma de rato (OCDE 476 modificado);</p> <p>- Teste de micronúcleo (OCDE 487 modificado) em conjunto com um ensaio de mutação genética</p>	<p>- Estratégia sensível à detecção de diferentes mecanismos de indução de danos genéticos. (ISO, 2014b; ISO, 2015b)</p> <p>- Os métodos de teste <i>in vivo</i> são considerados como uma abordagem do tipo peso de evidência, aplicável frente à inviabilidade de condução de testes <i>in vitro</i> ou como uma espécie de “contraprova” aos achados positivos ou divergentes obtidos por métodos <i>in vitro</i>.</p> <p>- Para todos os testes <i>in vitro</i> é necessário que se demonstre a captura de nanomateriais para que sua potencial exposição ao DNA possa ser considerada. (SCENIHR, 2015)</p> <p>- O Teste de Mutação Bacteriana Reversa, conhecido como Teste de Ames (<i>Ames bacterial reverse mutation assay</i> – OCDE 471), não é aplicável à avaliação de nanomateriais, devido a sua propensão a</p>

		<p>ou ensaio de linfoma de rato;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ensaio do cometa. <p>Em relação às metodologias de teste <i>in vivo</i>, seriam recomendados:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Teste de micronúcleo (OCDE 474 modificado); - Teste de aberração cromossômica (OCDE 475 modificado); - Teste do cometa (OCDE 489 modificado). 	<p>resultados falso-negativos. Isso porque a estrutura celular das bactérias atua como uma barreira à difusão de nanomaterial, especialmente, de aglomerados (ISO, 2017a).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caso condução de teste <i>in vivo</i> seja necessária, sua escolha deve ser definida por especialista, considerando o caso concreto e achados advindos dos testes <i>in vitro</i> e demais testes de toxicidade (SCENIHR, 2015) (ISO, 2017a). - Quanto às metodologias referenciadas na coluna à esquerda, essas deverão ser consideradas sempre que disponíveis em versões modificadas e validadas para dispositivos médicos. - Os resultados dos estudos de genotoxicidade podem ser úteis para predição de carcinogenicidade de nanomateriais, sendo a avaliação desse desfecho então considerada.
7.	Hemocompatibilidade (avaliação de hematologia, trombose, coagulação, plaquetas e sistema complemento).	<p>Produtos de superfície nanoestruturada podem ser avaliados pelas metodologias descritas na norma ISO 10993-4 (ISO, 2017b).</p> <p>Nanomateriais e nano-objetos livres impõem maiores dificuldades devido a sua maior relação superfície/volume, à formação do complexo nanomaterial-corona e à nanobiointeração estabelecida, e seu potencial para agregação/aglomeração – requerendo, portanto, métodos diferenciados (preferencialmente, reconhecidos e validados) (ISO, 2017a).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - De modo geral, trata-se de avaliação aplicável a produtos que entrem em contato com a circulação sanguínea, apesar de também ser aplicável a condições de contato indireto, proporcionado pela liberação de nanomateriais ou nano-objetos fora do sistema circulatório, que sofram translocação e alcancem esse sistema. - A hemocompatibilidade é um aspecto chave a ser considerado para produtos que apresentem superfície nanoestruturada, nanomateriais livres ou que gerem nano-objetos incidentais, frente ao seu potencial para deflagrar a formação de trombos ou mesmo de resposta imunológica (via complemento). - O potencial para translocação dessas estruturas para a corrente sanguínea pode ser identificado pelo estudo toxicocinético, que nesse caso apontará para a necessidade de avaliação de hemocompatibilidade. - Para esse desfecho, as propriedades físico-químicas do nanomaterial, nanoestrutura ou nano-objeto assumem relevância ímpar (principalmente aquelas avaliadas em meio biológico relevante), por modularem suas nanobiointerações, inclusive a nível imunológico.
8.	Implantação	<ul style="list-style-type: none"> - Metodologia de teste <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Teste aplicável a produtos implantáveis. - Sua condução deve levar em consideração a rota de exposição do produto. - Seu protocolo pode ser expandido de modo que os testes de toxicidade sejam nele incorporados. - Para avaliação de nano-objetos livres, injeção direta no tecido alvo pode ser considerada (ISO, 2017a).

9.	Toxicidade Reprodutiva/De-senvolvimental	A diretriz OCDE 421 pode ser útil como método de triagem para obtenção de informações iniciais sobre esse desfecho, e por conseguinte, para avaliação de perigos a ele relacionados (ISO, 2017a).	<p>- Essa avaliação pode ser requerida caso o nanomaterial ou seus metabólitos alcancem os órgãos reprodutivos – o que pode ser evidenciado por meio do estudo toxicocinético (SCENIHR, 2015) (ISO, 2017a).</p> <p>- Dispositivos que possam impactar o sistema reprodutivo (por exposição prolongada ou permanente do produto ou pela presença de nanopartículas ou lixiviáveis de nanomaterial cuja eliminação completa não tenha sido demonstrada) também devem ter essa avaliação considerada (ISO, 2017a).</p>
10.	Degradação	<p>Os mecanismos de degradação podem ser simulados <i>in vitro</i> para determinação das taxas de degradação e liberação de substâncias, subprodutos ou nano-objetos tóxicos para estimativa de exposição.</p> <p>Testes <i>in vivo</i> também podem ser requeridos.</p>	<p>- Os testes de degradação devem ser considerados para dispositivos:</p> <p>a) projetados para serem absorvidos;</p> <p>b) cujo uso pretendido seja superior a 30 dias;</p> <p>c) com potencial para sofrer processos de degradação, desgaste, atrito, abrasão, polimento, corrosão – e gerar nano-objetos (AFSSAPS, 2011);</p> <p>d) cuja composição indique que produtos de degradação tóxicos possam ser liberados no organismo.</p>
11.	Estudos de Toxicocinética	Tipo de estudo que envolve a avaliação de processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção – sendo por isso considerados para produtos que entrem em contato direto como o organismo, com especial ênfase àqueles que sejam implantáveis, que contenham nanomateriais livres e/ou que apresentem/liberem produtos de degradação em nanoescala.	<p>- Para sua condução, devem ser considerados aspectos relacionados:</p> <p>a) à finalidade/natureza do produto (se é absorvível, se foi projetado para contato de longo prazo, se sofre processos de corrosão ou degradação (conhecida ou provável);</p> <p>b) ao seu potencial para liberação de quantidades substanciais de produtos de degradação reativos ou potencialmente tóxicos, lixiviáveis e/ou nano-objetos incidentais e íons durante seu ciclo de vida (ISO, 2018a).</p>
12.	Imunotoxicidade	<p>Testes de Toxicidade subaguda (28 dias) ou subcrônica (90 dias) – também conhecidos como testes de toxicidade repetida – podem fornecer as primeiras indicações de imunossupressão e/o imunoestimulação (ISO, 2017a).</p> <p>Para dispositivos médicos (incluindo-se materiais de uso em Saúde que contenham nanomateriais),</p>	<p>Sua condução deve levar em consideração:</p> <p>a) a natureza química dos materiais;</p> <p>b) dados sugestivos de efeitos imunotóxicos (detectáveis durante os testes de toxicidade repetida pela captura de nanomateriais pelas células do sistema fagocitário mononuclear);</p> <p>c) potencial imunogênico desconhecido do material objeto de interesse.</p>

		<p>recomenda-se a condução de estudos de implantação prolongados para investigação do desfecho de imunotoxicidade. (ISO, 2017a).</p> <p>Outra opção considerada são os modelos <i>in vitro</i> para avaliação de vias de sinalização em linhagens imunológicas específicas (ISO, 2017a).</p>	
--	--	--	--

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Cumprе ressaltar que, em sendo os métodos de teste atualmente empregados para avaliação de toxicidade de nanomateriais, versões adaptadas de métodos desenvolvidos para análise de substâncias químicas, e que interferências podem ocorrer e comprometer sua interpretação – uma boa compreensão dos ensaios [disponíveis para análise do desfecho toxicológico de interesse], de como eles funcionam e de como as nanopartículas se comportam no sistema de ensaio e em relação aos parâmetros medidos mostram-se como aspectos fundamentais para determinação de um plano experimental sistemático e de interpretação adequada dos dados, conforme asseverado por Stone, Johnston e Schins (2009).

Ademais, frente às diferentes aplicações e especificidades físico-químicas inerentes aos diversos tipos de nanomateriais, faz-se oportuno enfatizar a necessidade de avaliações nanotoxicológicas caso a caso, ainda baseadas em metodologias *in vitro* e *in vivo* convencionais adaptadas, devido à indisponibilidade de abordagens preditivas robustas e suficientemente validadas, aplicáveis tanto ao processo de caracterização físico-química e biológica do nanomaterial, como à avaliação de segurança biológica do material de uso em saúde que contenha ou seja constituído por nanomateriais, também baseada em abordagem caso a caso, pela singularidade tecnológica do produto.

Nesses termos, as Diretrizes ora apresentadas devem ser tomadas como orientações, tal como o são, já que representam as impressões da autora e não da instituição da qual faz parte, não possuindo, portanto, *status* normativo ou poder vinculante – motivo pelo qual devem ser consideradas à luz da legislação sanitária vigente aplicável a materiais de uso em saúde, às normas técnicas de referência cabíveis e documentos globalmente harmonizados, caso existentes.

Por fim, cabe mencionar que as considerações até aqui realizadas não são exaustivas. Assim, esclarecimentos e/ou análises adicionais poderão ser requeridas pela autoridade regulatória, mediante ato administrativo próprio devidamente motivado.

5.1.4 Reporte de Informações

O consolidado dos dados obtidos, tanto no processo de caracterização físico-química como de avaliação de segurança biológica, para fins regulatórios, deve ser apresentado sob a forma de relatórios individuais ou como um relatório único, desde que devidamente instruído e subsidiado pelo detalhamento necessário à comprovação de segurança do produto objeto de interesse, conforme o uso pretendido.

Para tanto, descrição detalhada do material de uso em saúde que contenha ou seja constituído por nanomateriais deve ser apresentada. Informações relacionadas ao seu *design* e processamento até a obtenção do produto acabado – tais como desenho e especificações técnicas, estrutura e composição, etapas de manufatura, processamentos e principais controles implementados, inclusive em relação à adição de nanomateriais, além de informações relacionadas à finalidade e uso pretendido do produto devem ser consideradas.

Finda essa exposição introdutória sobre o dispositivo e a tecnologia “nano” a ele incorporada, faz-se oportuno apresentá-la de modo pormenorizado – considerando-se a introdução e o histórico de sua utilização em materiais de uso em saúde (de forma geral e específica, conforme aplicação do produto objeto de interesse), forma de apresentação do nanomaterial no dispositivo (livre, fixo ou incorporado a matriz de outro material); finalidade e diferenciais/benefícios alcançados pelo seu emprego no produto; assim como a descrição de sua natureza, constituição, estrutura, composição química/identidade; método(s) de síntese aplicado(s) para sua obtenção e presença de eventuais resíduos/impurezas.

Na sequência, apresentação do processo de caracterização das propriedades físico-químicas e/ou morfológicas e topográficas do nanomaterial empregado (conforme aplicável) deve ser realizada. Informações relacionadas ao racional para determinação dos atributos avaliados, sua descrição e relevância (em relação ao nanomaterial e sua apresentação no produto em que estará contido), bem como preparo da amostra (incluindo a identificação de protocolos aplicados), métodos analíticos empregados (escopo em termos de material, intervalo de medição e/ou concentração e incerteza da medição; condições de exposição; descrição do

procedimento; justificativa técnica para determinação e escolha de outros métodos complementares à análise do atributo objeto de interesse), resultados obtidos e sua discussão à luz da literatura e de critérios de aceitação estabelecidos, sendo nela também destacados os diferenciais identificados em relação às propriedades manifestadas pelo mesmo material em macroescala.

Ressalta-se que todas essas informações devem ser consideradas para cada um dos atributos avaliados. Ademais, recomenda-se, conforme disposto pelo documento da Agência Regulatória Francesa (*Agence Nationale de Sécurité du Medicament et des Produits de Santé – ANSM*)²⁷ que as mensurações sejam realizadas em número de amostras apropriado. Quanto a não avaliação de algum atributo importante, seja por inaplicabilidade ou inviabilidade técnica, essa deve ser justificada sob bases técnico-científicas sólidas.

Cumpra ponderar, que a caracterização supra referenciada deve contemplar tanto o nanomaterial original como o nanomaterial disperso em meio biológico relevante, conforme o contexto de aplicação clínica do produto acabado – para que suas identidades sintética e biológica sejam melhor compreendidas e correlacionadas aos achados obtidos na avaliação toxicológica.

Outra etapa importante a ser considerada na documentação atinente à avaliação do nanomaterial utilizado, refere-se a sua triagem toxicológica. A escolha dos testes realizados, bem como identificação/referência do protocolo ou metodologia adotados, bem como descrição do preparo da amostra, definição e justificativa para dose e métrica de dose aplicada, eventuais adequações metodológicas realizadas (acompanhadas de justificativa técnica embasada), bem como considerações relacionadas às limitações do método e a necessária adoção de outra(s) metodologia(s) (baseadas em mecanismos distintos) para avaliação do desfecho toxicológico de interesse deverão ser reportadas.

Quanto à avaliação de segurança biológica do produto acabado, racional para o planejamento e execução dos testes identificados como necessários deve ser apresentado. Para tanto, informações relacionadas à categorização do produto, cenário de exposição (rota de exposição, tecido/fluido em contato, frequência/duração do contato, biodisponibilidade do nanomaterial ou de nano-objetos), e principais achados de sua caracterização (incluindo-se aquela relacionada ao nanomaterial nele contido) deverão ser apresentadas, para que seja possível avaliar a pertinência, aplicabilidade e abrangência da avaliação de segurança biológica

²⁷ Tradução nossa: Agência Nacional de Segurança de Medicamentos e Produtos para Saúde (ANSM).

conduzida, bem como sua capacidade para identificar e caracterizar riscos relacionados ao nanomaterial contido no produto ou aos nano-objetos dele liberados.

Cada um dos relatórios de teste apresentados deve identificar a norma técnica de referência utilizada, bem como sua versão (se adaptada ou não à avaliação de dispositivos médicos que contenham ou sejam constituídos por nanomateriais) – informação essa diretamente relacionada à metodologia de teste empregada. Para casos em que a norma não tenha sido validada para esse tipo de análise, justificativa técnica para sua utilização, bem como eventuais modificações metodológicas implementadas para contornar eventuais interferências ou artefatos (conhecidos ou identificados) deverão ser explicitadas à luz da literatura corrente.

No que tange à amostra teste utilizada (produto propriamente dito, parte representativa ou solução de extração), essa deve ser identificada e devidamente caracterizada, inclusive quanto ao nanomaterial nela contido. Informações relevantes relacionadas ao procedimento de preparo de amostra; seleção e descrição da dose, bem como justificativa para sua determinação; linhagem celular, tipo de cultura ou modelo animal selecionado; material de referência utilizado; identificação dos controles positivo e negativo adotados; bem como descrição da metodologia implementada, juntamente com a apresentação e discussão dos resultados obtidos devem ser consideradas. Eventuais limitações do método de teste e suas implicações sobre a interpretação dos resultados também deverão ser pontuadas e discutidas à luz da literatura.

Por fim, análise global dos principais achados obtidos nas análises realizadas, respaldada por literatura científica relevante relacionada tanto ao produto objeto de análise (inclusive quanto a sua constituição e características nano-específicas, se disponível), como a dispositivo comparável não constituído por nanomaterial – deve ser realizada, de modo a subsidiar a avaliação dos riscos biológicos identificados quanto a sua aceitabilidade e/ou necessária adoção de medidas de controle, com vistas a garantir a segurança biológica do material de uso em saúde que contenha, seja constituído ou produza nanomateriais, em seu contexto de utilização clínica. Portanto, demonstração de relação risco-benefício favorável aos benefícios previstos para o referido produto quando comparados aos potenciais riscos residuais mostra-se imperativa à confirmação do seu perfil de segurança toxicológica.

6 CONCLUSÕES

Pela extensão e abrangência do conteúdo recuperado e considerado neste trabalho, evidencia-se o rápido e dinâmico avanço científico experienciado pela Nanotecnologia nos últimos vinte anos, período em que impulsionou o surgimento de importantes áreas do conhecimento, fortemente, relacionadas a sua aplicação na área da saúde, tais como a Nanotoxicologia e a Nanomedicina, que por sua complexidade e potencialidade, respectivamente, têm demandado recursos intelectuais, estruturais e materiais significativos a uma melhor compreensão dos fenômenos físico-químicos e biológicos da gama de nanomateriais disponíveis, bem como de seus eventuais perigos nos possíveis cenários de utilização clínica, com vistas ao alcance de aplicações efetivas, mas principalmente, seguras sob uma perspectiva de risco.

Contudo, sistematização e harmonização são processos fundamentais à estruturação e consolidação de todo o conhecimento produzido até aqui, pois, apesar de vultoso, ele se constitui, em grande parte por publicações conflitantes e de baixa qualidade metodológica – o que tem comprometido a robustez dos avanços auferidos, a própria compreensão dos fenômenos observados e, por conseguinte, o progresso da Nanociência nos diversos campos em que sua aplicação seja vislumbrada, devido às várias lacunas de conhecimento ainda existentes. Tais processos alcançam desde aspectos ontológicos (de amadurecimento e padronização terminológica, ainda não atingidos, nos diversos âmbitos em que a Nanotecnologia transita), até metodológicos, procedimentais, metrológicos e técnicos base ao estabelecimento de protocolos validados e difundidos para obtenção de resultados críveis, reproduzíveis e comunicáveis entre as esferas acadêmico-científica, regulatória, legislativa e social.

Nesse sentido, entender o cenário para balizar estratégias colaborativas que viabilizem a interlocução, o alinhamento de interesses/necessidades, a curadoria e o compartilhamento de informações confiáveis e relevantes para construção de uma base científica sólida e sustentável, capaz de subsidiar o progresso de abordagens baseadas em metodologias alternativas advindas de modelos *in vitro* avançados e/ou *in silico* bem estabelecidos e validados – torna-se imperativo à superação dos desafios atuais. No entanto, sendo esse um movimento ainda incipiente e limitado, por sua própria natureza, dimensionalidade e propósito, muito ainda há que se trabalhar para sua consecução em um âmbito mais restrito, circunscrito às principais jurisdições engajadas no tema, para posterior alcance global.

Sob essa perspectiva, e com o intuito de tentar contribuir para o alinhamento e avanço regional desse processo, mesmo que sob uma perspectiva mais específica, é que se propôs o presente trabalho, que por sua vertente exploratória recuperou literatura abrangente e diversa, necessária à compreensão de um contexto geral (relacionado à nanotecnologia no âmbito da saúde, com enfoque a sua aplicação na área de materiais de uso em saúde), e também específico (relativo à nanotoxicologia e regulação aplicadas ao contexto desta categoria de produtos médicos) para proposição de diretrizes regulatórias base à avaliação de segurança biológica de materiais de uso em saúde constituídos por nanomateriais, sob uma perspectiva de risco, traçadas a partir do conhecimento corrente (até então marcado por incertezas e importantes lacunas) e da prática regulatória atual (limitada pela falta de base constitutiva sólida para regulação de novas tecnologias, hoje, avaliadas a partir da legislação sanitária vigente, sendo suas especificidades tratadas por abordagem do tipo caso a caso).

Abordagem essa, que tem se mostrado insustentável ao longo dos anos, frente a uma realidade inventiva de crescimento constante e vertiginoso, como aquela em que a Nanotecnologia e os nanomateriais se inserem, que desafia os modelos e ferramentas de avaliação aplicados aos processos de caracterização, análise toxicológica e de risco, assim como a própria estrutura regulatória global; impondo aos atores envolvidos a necessidade de cooperação e engajamento para o avanço e desenvolvimento de abordagens preditivas, integradas e validadas capazes – não só de oferecer resultados mais assertivos e úteis à aplicação segura dos diversos nanomateriais disponíveis no contexto biomédico, e ao desenvolvimento de novas gerações de nanomateriais a partir da premissa “*safe by design*”; mas de viabilizar a racionalização, otimização e mesmo, acessibilidade a recursos e conhecimentos importantes ao progresso científico e regulatório, sob bases convergentes, mais consistentes e democráticas.

Embora esta seja a expectativa, sua concretude ainda se distancia da realidade factual, razão pela qual academia, autoridades regulatórias e indústria precisam trabalhar conjuntamente, e assim somar esforços, recursos, conhecimentos e experiências para tornar a produção científica mais célere, consistente e direcionada não apenas à redução de lacunas e superação de obstáculos técnicos, mas a uma compreensão fenomenológica ampliada e suficiente ao progresso de questões relevantes, como a determinação da segurança de uso de nanomateriais em saúde, com destaque àqueles empregados em materiais de uso em saúde – frente a sua diversidade e versatilidade de uso nos domínios de prevenção, tratamento e reabilitação.

Nesse sentido, a consecução do presente trabalho, sobretudo no que concerne à proposição de diretrizes regulatórias direcionadas à avaliação de segurança de biológica dessa

categoria de dispositivos, poderá não apenas oportunizar a retomada das discussões a respeito da incorporação de nanotecnologia aos produtos sujeitos à regulação sanitária (e sua segurança), mas sensibilizar a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, assim como o setor regulado/indústria, a Academia e os legisladores para a necessidade de uma interlocução mais próxima e plural que viabilize o amadurecimento e trabalho coletivos na instituição de regramentos e políticas públicas factíveis e responsáveis, alicerçados em bases científicas, bem como em disposições e práticas adotadas por jurisdições na vanguarda do tema – tornando-se assim, em última análise, potencial referência e ponto de partida para iniciativas colaborativas diversas e de avanço científico na temática de nanosseguurança em âmbito nacional.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estima-se que a indústria da nanomédica esteja à beira de uma grande revolução e que deva crescer a 350 bilhões até 2025 (Grand View Research I, 2017 apud KARAKUS; BILGI; WINKLER, 2020, p. 2). Isso posto e considerando-se o cenário apresentado por este trabalho, quanto ao processo constitutivo da Nanociência aplicada ao contexto biomédico, algumas ponderações fazem-se oportunas:

- É premente a necessidade de revisão e redirecionamento do modelo de análise, atualmente, adotada por cientistas e reguladores, para avaliação de nanomateriais e produtos que os contenham, baseada em abordagem do tipo caso a caso. A realidade evolutiva e disruptiva imposta pela Nanotecnologia impulsiona a comunidade científica ao desenvolvimento de metodologias alternativas realistas e computacionais preditivas, bem como de estratégias integradas (que também se utilizem dos achados produzidos por metodologias tradicionais adaptadas) validadas para obtenção de dados mais precisos e confiáveis para análise de risco e tomada de decisão quanto à segurança e determinação da relação risco-benefício de determinado nanomaterial no contexto de aplicação clínica proposto; assim como para superação dos inúmeros desafios técnicos que, hoje, tanto comprometem a compreensão fenomenológica e o progresso científico consistente da Nanotecnologia;

- Nesse sentido, cumpre pontuar que a análise por agrupamento ou categorização de nanomateriais, hoje, já utilizada como estratégia de triagem e priorização de nanomateriais de maior perigo (com vistas a minimizar testagens desnecessárias) tende a evoluir e ganhar espaço com o avanço das metodologias supramencionadas, ao viabilizar a racionalização e otimização de recursos, bem como a melhoria geral da qualidade e completude das evidências geradas, em um futuro não tão distante;

- Para tanto, esforço colaborativo para continuidade e expansão de iniciativas de ordem técnica e normativa como aquelas instituídas nos âmbitos da OCDE, ISO e ASTM, por exemplo, tornam-se imperativas ao avanço, disseminação, alinhamento e incorporação de informações qualificadas pelos diferentes atores envolvidos e interessados no desenvolvimento e aplicação da Nanotecnologia e da Nanomedicina;

- Nesse sentido, o estreitamento das relações entre pesquisadores, legisladores e reguladores contribuiria sobremaneira para ampliação, alinhamento e convergência de perspectivas; para aprimoramento, reorientação de práticas e racionalização de recursos; e por

consequente, para obtenção de produtos científicos qualificados, harmônicos e plurais em sua aplicabilidade;

- Sob essa ótica, o trabalho ora apresentado poderia se tornar um instrumento importante à interlocução, ao amadurecimento e redução de assimetria informacional entre os diferentes partícipes em discussões no domínio da Nanotecnologia aplicada à saúde; além de um possível referencial regulatório e científico no âmbito da própria Anvisa e de outras esferas governamentais engajadas no processo de construção e consolidação de melhores práticas ao avanço qualificado da Nanociência em território nacional;

- Por fim, consolidação e curadoria de dados de caracterização físico-química, topográfica e morfológica, bem como de desfechos biológicos relevantes constituir-se-iam estratégias relevantes à superação de adversidades relacionadas à acessibilidade de dados confiáveis e à consolidação de dados que subsidiem avaliações mais completas e, inclusive de longo prazo.

8 REFERÊNCIAS

ABDI. **Agenda Tecnológica Setorial – ATS Complexo Industrial da Saúde. NANOTECNOLOGIA.** [s.l.: s.n.].

ABDI, A. B. DE D. I. **Manual de Registro e Cadastramento de Materiais de Uso em Saúde.** Brasília: [s.n.].

ACCOMASSO, L.; CRISTALLINI, C.; GIACHINO, C. **Risk assessment and risk minimization in nanomedicine: A need for predictive, alternative, and 3Rs strategies.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, n. MAR, p. 1–7, 2018.

ADABI, M. et al. **Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine.** *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 45, n. 4, p. 833–842, 2016.

AFANTITIS, A. et al. **NanoSolveIT Project: Driving nanoinformatics research to develop innovative and integrated tools for in silico nanosafety assessment.** *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020.

AFSSAPS, A. F. DE S. S. DES P. DE S. **Biological Assessment of Medical Devices containing Nanomaterials - Scientific Report.** France: [s.n.].

AI, J. et al. **Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 1117–1127, 2011.

AKÇAN, R. et al. **Nanotoxicity: A challenge for future medicine.** *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 50, n. 4, p. 1180–1196, 2020.

ALKILANY, A. M. et al. **Misinterpretation in Nanotoxicology: A Personal Perspective.** *Chemical Research in Toxicology*, v. 29, n. 6, p. 943–948, 2016.

ALSALEH, N. B.; BROWN, J. M. **Immune responses to engineered nanomaterials: Current understanding and challenges.** *Current Opinion in Toxicology*, v. 10, p. 8–14, 2018.

ALSALEH, N. B.; BROWN, J. M. **Engineered Nanomaterials and Type I Allergic Hypersensitivity Reactions.** *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. February, p. 1–14, 2020.

ANVISA. **CONSULTA PÚBLICA Nº 730, DE 14 DE OUTUBRO DE 2019.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component%0Ahttp://www.albayan.ae%0Ahttps://scholar.google.co.id/scholar?hl=en&q=APLIKASI+PENGGENA>.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. **Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 258, n. 2, p. 151–165, 2012.

AUFFAN, M. et al. **Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental , health and safety perspective.** *Nature Nanotechnology*, v. 4, n. October, 2009.

AUSTRALIA, T. **Consultation :** Proposed regulatory options for medical devices containing nanomaterials. n. February, p. 1–34, 2021.

AZHARZADEH, M. et al. **Nanotoxicology: Advances and pitfalls in research methodology.** *Nanomedicine*, v. 10, n. 18, p. 2931–2952, 2015.

BAIMANOV, D.; CAI, R.; CHEN, C. **Understanding the Chemical Nature of Nanoparticle-Protein Interactions.** *Bioconjugate Chemistry*, v. 30, n. 7, p. 1923–1937, 2019.

BALBUS, J. M. et al. Meeting report: **Hazard assessment for nanoparticles-report from an interdisciplinary workshop.** *Environmental Health Perspectives*, v. 115, n. 11, p. 1654–1659, 2007.

BAÑARES, M. A. et al. **CompNanoTox2015**: novel perspectives from a European conference on computational nanotoxicology on predictive nanotoxicology. *Nanotoxicology*, v. 11, n. 7, p. 839–845, 2017.

BAUER, A. et al. **Risk Governance and Research & Innovation Priorities in Nanotechnologies - First briefing report with a focus on food, health and the energy sector**. European Commission. [s.l: s.n.].

BHATTACHARJEE, S.; BRAYDEN, D. J. **Development of nanotoxicology: Implications for drug delivery and medical devices**. *Nanomedicine*, v. 10, n. 14, p. 2289–2305, 2015.

BILLI, F.; CAMPBELL, P. **Nanotoxicology of metal wear particles in total joint arthroplasty: A review of current concepts**. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2010.

BITOUNIS, D. et al. **Detection and analysis of nanoparticles in patients: a critical review of the status quo of clinical nanotoxicology**. n. June, p. 1–33, 2015.

BLEEKER, E. A., et al. **Considerations on the EU definition of a nanomaterial: science to support policy making**. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 65, 119–125, 2013

BORASCHI, D. et al. **Addressing Nanomaterial Immunosafety by Evaluating Innate Immunity across Living Species**. *Small*, v. 16, n. 21, p. 1–25, 2020.

BORASCHI, D.; CASTELLANO, L. R. C.; ITALIANI, P. Editorial: **Interaction of nanomaterials with the immune system: Role in nanosafety and nanomedicine**. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. NOV, p. 1–2, 2017.

BORM, P.J. et al. **The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC**. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(3):11, 2006.

BOTELHO, R. G.; OLIVEIRA, C. C. O. **Literaturas Branca e Cinzenta: Uma Revisão Conceitual**. v. 44, n. 3, p. 501–513, 2017.

BOUWMEESTER, H. et al. **Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices**. *Nanotoxicology*, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2011.

BOVERHOF, D. R. et al. **Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations**. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 73, n. 1, p. 137–150, 2015.

BRASIL, A. N. DE V. S. **Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001**. Aprovar o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, em 06 de novembro de 2001, , 2001.

BRASIL, A. N. DE V. S. **Resolução RDC Nº 14 , de 5 DE abril de 2011**. Institui o regulamento técnico com os requisitos para agrupamento de materiais de uso em saúde para fins de registro e cadastro na ANVISA e adota etiquetas de rastreabilidade para produtos implantáveis. Brasília. *Diário Oficial da União*, em 11 de abril de 2011.

BRASIL, A. N. DE V. S. **Agenda Regulatória Biênio 2013 - 2014**. [s.l: s.n.].

BRASIL, A. N. DE V. S. **Portaria Anvisa nº 1.358, de 20 de agosto de 2014**. Brasil, 2014b.

BRASIL, A. N. DE V. S. **Agenda Regulatória Ciclo Quadrienal 2013-2016 Biênio 2015-2016**. Brasília: [s.n.].

BRASIL, A. N. DE V. S. **Resolução RDC nº 546, de 30 de agosto de 2021**. Dispõe sobre os requisitos essenciais de segurança e eficácia aplicáveis aos produtos para saúde. Brasil, 2021.

BRASIL, M. DA C. T. I. E C. **Plano de Ação de CT&I para Tecnologias Convergentes e Habilitadoras - Volume I - Nanotecnologia**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/tecnologia/tecnologias_convergente

s/arquivos/cartilha_plano_de_acao_nanotecnologia.pdf>.

BRASIL, M. DA C. T. I. E C. **Portaria nº 3.459, de 26 de julho de 2019.** Brasil. **Diário Oficial da União**, em 08 de agosto de 2019. Edição 152, Seção 1, Página 286., , 2019.

BURDEN, N. et al. **Aligning nanotoxicology with the 3Rs: What is needed to realise the short, medium and long-term opportunities?** **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 91, n. February, p. 257–266, 2017.

BURELLO, E.; WORTH, A. P. **A rule for designing safer nanomaterials: Do not interfere with the cellular redox equilibrium.** **Nanotoxicology**, v. 9, n. S1, p. 116–117, 2015.

CAI, X. et al. **Molecular Mechanisms, Characterization Methods, and Utilities of Nanoparticle Biotransformation in Nanosafety Assessments.** **Small**, v. 16, n. 36, p. 1–19, 2020.

CANADY, R. A. **The Uncertainty of Nanotoxicology: Report of a Society for Risk Analysis Workshop.** **Risk Analysis**, v. 30, n. 11, p. 1663–1670, 2010.

CATALÁN, J.; NORPPA, H. **Safety aspects of bio-based nanomaterials.** **Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 2–9, 2017.

CATALÁN, J.; STOCKMANN-JUVALA, H.; NORPPA, H. **A theoretical approach for a weighted assessment of the mutagenic potential of nanomaterials.** **Nanotoxicology**, v. 11, n. 8, p. 964–977, 2017.

CHARRIÈRE, A.; DUNNING, B. **Timeline : Nanotechnology. Policy and Regulation in Canada, Australia, the European Union, the United Kingdom and United States.** [s.l: s.n.].

CHEN, C.; LEONG, D.; LYNCH, I. **Rethinking Nanosafety Part II: Leveraging Progress to Pioneer New Approaches and Solutions.** **Small**, v. 16, n. 36, p. 1–3, 2020a.

CHEN, C.; LEONG, D. T.; LYNCH, I. **Rethinking Nanosafety: Harnessing Progress and Driving Innovation.** **Small**, v. 16, n. 21, p. 2–5, 2020b.

CHEN, R. et al. **Intelligent testing strategy and analytical techniques for the safety assessment of nanomaterials.** **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 24, p. 6051–6066, 2018.

CLARK, K. A.; WHITE, R. H.; SILBERGELD, E. K. **Predictive models for nanotoxicology: Current challenges and future opportunities.** **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 361–363, 2011.

CLIFT, M. J. D.; GEHR, P.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. **Nanotoxicology: A perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative.** **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 723–731, 2011.

CLIFT, M. J. D.; JENKINS, G. J. S.; DOAK, S. H. **An Alternative Perspective towards Reducing the Risk of Engineered Nanomaterials to Human Health.** **Small**, v. 16, n. 36, p. 1–6, 2020.

COHEN, J. M.; DELOID, G. M.; DEMOKRITOU, P. **A critical review of in vitro dosimetry for engineered nanomaterials.** **Nanomedicine**, v. 10, n. 19, p. 3015–3032, 2015.

COLQUHOUN, H. L. et al. **Scoping reviews: Time for clarity in definition, methods, and reporting.** **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 67, n. 12, p. 1291–1294, 2014.

COMMISSION, E. **Definition of a nanomaterial.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>.

COSTA, P. M.; FADEEL, B. **Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk.** **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 299, p. 101–111, 2015.

CRONIN, J. G. et al. **Nanomaterials and innate immunity: A perspective of the current status in nanosafety.** [s.l: s.n.]. v. 33

DAUDT, H. M. L.; VAN MOSSEL, C.; SCOTT, S. J. **Enhancing the scoping study methodology: A large, inter-professional team's experience with Arksey and O'Malley's**

framework. **BMC Medical Research Methodology**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE MATTEIS, V.; RINALDI, R. **Toxicity assessment in the nanoparticle era. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1048, n. Iso 2008, p. 1–19, 2018.

DENMARK, DANISH MEDICINES AGENCY. **Medical Devices**. May 15th, 2020. Disponível em: <<https://laegemiddelstyrelsen.dk/en/devices/>>. Acesso em: 25/08/2021.

DHAWAN, A.; SHARMA, V.; PARMAR, D. **Nanomaterials: A challenge for toxicologists. Nanotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2009.

DOAK, S. H. et al. **Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 285–293, 2009.

DOAK, S. H.; PFUHLER, S. **Nanotoxicology. Preface. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 2, p. 135, 2009.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; NEUN, B.W.; CLOGSTON, J.D.; DING, H.; LJUBIMOVA, J.; MCNEIL, S.E. **Ambiguities in applying traditional Limulus amoebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. Nanomedicine (2010)** 5(4):555–62. doi:10.2217/nmm.10.29.

DOBROVOLSKAIA, M.A., NEUN, B.W., CLOGSTON, J.D., GROSSMAN, J.H., McNEIL, S.E. **Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation. Nanomedicine (Lond.)**. 2014, 9 pp. 1847-1856.

DOCTER, D. et al. **No king without a crown-impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine. Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 503–519, 2015.

DONALDSON, K.; POLAND, C. A.; SCHINS, R. P. F. **Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. Nanotoxicology**, v. 4, n. 4, p. 414–420, 2010.

DONNER, M. et al. **Genotoxicity of engineered nanomaterials. Nanotoxicology**, v. 4, n. 4, p. 345–346, 2010.

DOWLING, A. et al. **Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties**. The Royal Society The Royal Academy of Engineering Report. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies++opportunities+and+uncertainties#0>>.

DROBNE, D. **Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 58, n. 4, p. 471–478, 2007.

DUSINSKA, M. et al. **Towards an alternative testing strategy for nanomaterials used in nanomedicine: Lessons from NanoTEST. Nanotoxicology**, v. 9, n. S1, p. 118–132, 2015.

DUSINSKA, M. et al. **Immunotoxicity, Genotoxicity and Epigenetic Toxicity of Nanomaterials: New strategies for toxicity testing? Food and Chemical Toxicity**, 2017.

DUVALL, M. N. (ED. . **FDA Regulation of Nanotechnology The American Bar Association's Nanotechnology Project**. [s.l: s.n.].

EDE, J. D. et al. **Translating Scientific Advances in the AOP Framework to Decision Making for Nanomaterials. Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 6, jun. 2020.

ERBIS, S. et al. **Review of Research Trends and Methods in Nano Environmental, Health, and Safety Risk Analysis. Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis**, v. 36, n. 8, p. 1644–1665, 2016.

EUROPEAN COMMISSION. **Recommendation on the definition of a nanomaterial. (2011/696/EU) Official Journal of the European Union. European Union Official Journal of the European Union**, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003>>

EUROPEAN UNION. **Regulation (EU) 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on Medical Devices**, amending Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 and repealing Council

Directives 90/385/EEC and 93/42/EE. . 2017, p. 1–175.

FADEEL, B. et al. **There's plenty of room at the forum: Potential risks and safety assessment of engineered nanomaterials.** *Nanotoxicology*, v. 1, n. 2, p. 73–84, 2007.

FADEEL, B. et al. **Keeping it real: the importance of material characterization in nanotoxicology.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015.

FADEEL, B. **Systems biology in nanosafety research.** *Nanomedicine*, v. 10, n. 7, p. 1039–1041, 2015.

FADEEL, B. et al. **Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials.** *Nature Nanotechnology*, v. 13, n. 7, p. 537–543, 2018.

FADEEL, B.; ALENIUS, H.; SAVOLAINEN, K. **Nanotoxicology.** *Toxicology*, v. 313, p. 1–2, 2013.

FAN, A. M.; ALEXEEFF, G. **Nanotechnology and nanomaterials: Toxicology, risk assessment, and regulations.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, n. 12, p. 8646–8657, 2010.

FARIA, M. et al. **Minimum information reporting in bio-nano experimental literature.** *Nature Nanotechnology*, v. 13, n. 9, p. 777–785, 2018.

FARRERA, C.; FADEEL, B. **It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 95, p. 3–12, 2015.

FELIU, N.; FADEEL, B. **Nanotoxicology: No small matter.** *Nanoscale*, v. 2, n. 12, p. 2514–2520, 2010.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. **Nanotoxicity: the growing need for in vivo study.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, n. 6, p. 565–571, 2007.

FOREST, V.; HOICHEPIED, J.-F.; POURCHEZ, J. **Importance of Choosing Relevant Biological End Points To Predict Nanoparticle Toxicity with Computational Approaches for Human Health Risk Assessment.** *Chemical Research in Toxicology*, v. 32, n. 7, p. 1320–1326, 2019.

FOREST, V.; POURCHEZ, J. **Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona.** *Materials Science and Engineering C*, v. 70, p. 889–896, 2017.

FORLONI, G. **Responsible nanotechnology development.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, n. 8, 2012.

FOULKES, R. et al. **The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: Current and future perspectives.** *Biomaterials Science*, v. 8, n. 17, p. 4653–4664, 2020.

FRANKEL, F. C.; WHITESIDES, G. M. **No Small Matter.** *Science on the Nanoscale*. 2009.

GAJEWICZ, A. **What if the number of nanotoxicity data is too small for developing predictive Nano-QSAR models? An alternative read-across based approach for filling data gaps.** *Nanoscale*, v. 9, n. 24, p. 8435–8448, 2017.

GEBEL, T.; MARCHAN, R.; HENGSTLER, J. G. **The nanotoxicology revolution.** *Archives of Toxicology*, v. 87, n. 12, p. 2057–2062, 2013.

GEERTSMA, R. E. et al. **Nanotechnologies in Medical Devices.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://rivm.openrepository.com/rivm/handle/10029/584200#>>.

GEORGE, S. et al. **The multi-facets of sustainable nanotechnology-Lessons from a nanosafety symposium.** *Nanotoxicology*, v. 9, n. 3, p. 404–406, 2015.

GOTTARDO, S. et al. **NANoREG Framework for the safety assessment of nanomaterials.** Italy: **European Commission - Join Research Centre**, 2017.

GREIM, H.; NORPPA, H. **Genotoxicity testing of nanomaterials - Conclusions.**

Nanotoxicology, v. 4, n. 4, p. 421–424, 2010.

GREISH, K.; THIAGARAJAN, G.; GHANDEHARI, H. **In vivo methods of nanotoxicology**. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 926p. 235–253.

GRIEGER, K. D.; HANSEN, S. F.; BAUN, A. **The known unknowns of nanomaterials**: Describing and characterizing uncertainty within environmental, health and safety risks. v. 3, n. September, 2009.

GUBALA, V. et al. **Engineered nanomaterials and human health: Part 1**. Preparation, functionalization and characterization (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 90, n. 8, p. 1283–1324, 2018.

HALAMODA-KENZAOU, B. et al. **Anticipation of regulatory needs for nanotechnology-enabled health products - The REFINE White Paper**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019.

HAMMAD, S.; BOLT, H. M. **Current developments in nanosafety research**. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 12, p. 2089–2091, 2014.

HARRIS, S. **The Regulation of Nanomedicine: Will the Existing Regulatory Scheme of the FDA Suffice?** **Richmond Journal of Law and Technology**, v. 16, n. 2, p. 1–25, 2009.

HARTUNG, T. & SABBIONI, E. **Alternative in vitro assay in nanomaterial toxicology**. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2011, 3 pp. 545–573.

HAYNES, C. L. **The emerging field of nanotoxicology**. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 587–588, 2010.

HEALTH CANADA. **Policy Statement on Health Canada's Working Definition for Nanomaterials**, 2011. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/science-research/reports-publications/nanomaterial/policy-statement-health-canada-working-definition.html>

HIGASHISAKA, K. et al. **Nano-safety research: Examining the associations among the biological effects of nanoparticles and their physicochemical properties and kinetics**. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 243–248, 2017.

HIMLY, M. et al. **When Would Immunologists Consider a Nanomaterial to be Safe?** Recommendations for Planning Studies on Nanosafety. **Small**, v. 16, n. 21, 2020.

HIRANO, S. **A current overview of health effect research on nanoparticles**. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 14, n. 4, p. 223–225, 2009.

HJORTH, R.; VAN HOVE, L.; WICKSON, F. **What can nanosafety learn from drug development?** The feasibility of “safety by design”. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 3, p. 305–312, 2017.

HOBSON, D. W. et al. **Applied Nanotoxicology**. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 5–16, 2016.

HOBSON, D. W. **Nanotoxicology: The Toxicology of Nanomaterials and Nanostructures**. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 3–4, 2016.

HRISTOZOV, D. R. et al. **Risk assessment of engineered nanomaterials: A review of available data and approaches from a regulatory perspective**. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 8, p. 880–898, 2012.

HU, X. et al. **Strategies and knowledge gaps for improving nanomaterial biocompatibility**. **Environment International**, v. 102, p. 177–189, 2017.

HUSSAIN, S. M. et al. **At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges**. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 1, p. 5–16, 2015.

HWANG, M. et al. **Risk assessment principle for engineered nanotechnology: In food and drug**. **Toxicological Research**, v. 28, n. 2, p. 73–79, 2012.

INGLE, A. P.; GUPTA, I.; RAI, M. **Toxicological Concerns of Nanomaterials Used in Biomedical Applications**. In: **Nanobiotechnology in Diagnosis, Drug Delivery, and Treatment**. First Edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons Ltd., 2020. p. 375–398.

ISIGONIS, P. et al. **Risk Governance of Emerging Technologies Demonstrated in Terms of its Applicability to Nanomaterials.** *Small*, v. 16, n. 36, 2020.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-17: **Biological evaluation of medical devices – Part 17: Establishment of allowable limits for leachable substances.** First edition. Geneva, Switzerland. 2002.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TS 10993-20: **Biological evaluation of medical devices – Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices.** First Edition. Geneva, Switzerland. 2006.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-5: **Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** Third Edition. Geneva, Switzerland. 2009.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-10: **Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests of skin sensitization.** Third Edition. Geneva, Switzerland. 2010a.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 29701 (en) **Nanotechnologies – Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems - lymulus ameobocyte lysate (LAL) test.** Geneva, Switzerland. 2010b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 13121: **Nanotechnologies – Nanomaterial Risk Evaluation.** Geneva, Switzerland. 2011.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 13014: **Nanotechnologies – Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment.** First edition. Geneva, Switzerland. 2012.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 16197: **Nanotechnologies – Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials.** Geneva, Switzerland. 2014a.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-3: **Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity.** Third edition. Geneva, Switzerland. 2014b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TS 80004-2: **Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects.** First edition. Geneva, Switzerland. 2015a.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 10993-33: **Biological evaluation of medical devices – Part 33: Guidance on testes to evaluate genotoxicity – Supplement to ISO 10993-3.** First edition. Geneva, Switzerland. 2015b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-6: **Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects of implantation.** Third edition. Geneva, Switzerland. 2016.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 10993-22: **Biological evaluation of medical devices – Part 22: Guidance on nanomaterials.** First edition. Geneva, Switzerland. 2017a.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-4: **Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of Tests for Interactions with Blood.** Third Edition. Geneva, Switzerland. 2017b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-16: **Biological Evaluation of Medical Devices – Part 16: Toxicokinetic Study Design for Degradation Products and Leachables.** Third Edition. Geneva, Switzerland. 2017c.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-1: **Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing within a risk management process.** Fifth Edition. Geneva, Switzerland. 2018a.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 19007: **Nanotechnologies – In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles**. First edition. Geneva, Switzerland. 2018b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 14971: **Medical devices – Application of risk management to medical devices**. Third edition. Geneva, Switzerland. 2019.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 22019: **Nanotechnologies – Considerations for performing toxicokinetic studies with nanomaterials**. First edition. Geneva, Switzerland. 2019b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-9: **Biological Evaluation of medical devices – Part 9: Framework for identification and qualification of potential degradation products**. Third Edition. Geneva, Switzerland. 2019c.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-19: **Biological evaluation of medical devices – Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials**. Geneva, Switzerland. 2020a.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-18: **Biological evaluation of medical devices – Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process**. Geneva, Switzerland. 2020b.

ISO. International Organization for Standardization. ISO/TR 24971: **Medical Devices – Guidance on the application of ISO 14971**. Geneva, Switzerland. 2020c.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 10993-23: **Biological Evaluation of medical devices – Part 23: tests for irritation**. First Edition. Geneva, Switzerland. 2021.

JAGIELLO, K. et al. **Nanomaterials in Medical Devices: Regulations' Review and Future Perspectives**. *Journal of Nanotoxicology and Nanomedicine*, v. 2, n. 2, p. 1–11, 2017.

JANUS, E. R.; DUBÉ, E.; GOLDBERG, S. **The Role of FDA in the Regulation of Manufactured Nanomaterials**. *Bloomberg Law Reports*, p. 1–7, 2014.

JEEVANANDAM, J. et al. **Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations**. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018.

JIA, J. et al. Editorial. **Nano-Bio Interactions: Ecotoxicology and Cytotoxicity of Nanomaterials**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. September, p. 1–2, 2020.

JOHNSTON, H. et al. **Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications**. *Journal of Controlled Release*, v. 164, n. 3, p. 307–313, 2012.

JOHNSTON, H. et al. **Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: Potential solutions to current and future challenges**. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 43, n. 1, p. 1–20, 2013.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. **In vitro assessments of nanomaterial toxicity**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, n. 6, p. 438–456, 2009.

JUILLERAT-JEANNERET, L. et al. **Biological impact assessment of nanomaterial used in nanomedicine**. Introduction to the NanoTEST project. *Nanotoxicology*, v. 9, n. S1, p. 5–12, 2015.

KALANGUTKAR, P. K. **Nanotechnology – Advancing the Field of Biomedical Engineering**. *International journal of Current Research and Review*, v. 7, n. 9, p. 66–70, 2015.

KALANTARI, H. **Nanotoxicology**. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, v. 17, n. 1–2, p. 81–89, 2015.

KARAKUS, C. O.; BILGI, E.; WINKLER, D. A. **Biomedical nanomaterials: applications, toxicological concerns, and regulatory needs.** *Nanotoxicology*, v. 15, n. 3, p. 331–351, 2020.

KARLSSON, H. L. et al. **Can the Comet Assay be Used Reliably to Detect Nanoparticle-Induced Genotoxicity?** *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2014.

KEEGAN, G. M.; LEARMONTH, I. D.; CASE, C. P. **A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants.** *Critical Reviews in Toxicology*, v. 38, n. 8, p. 645–674, 2008.

KRAEGELOH, A. **Nanosafety Research-An Ongoing Story.** *Chemical Research in Toxicology*, v. 31, n. 11, p. 1105, 2018.

KROLL, A. et al. **Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, n. 2, p. 370–377, 2009.

KRUG, H. F. **The uncertainty with nanosafety: Validity and reliability of published data.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 172, n. February, p. 113–117, 2018.

KRUG, H. F.; WICK, P. **Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge.** *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 50, n. 6, p. 1260–1278, 2011.

KRUG, H.; KRAEGELOH, A. **Nanosafety: Where Are We Now and Where Must We Go?** *Chemical Research in Toxicology*, v. 32, n. 4, p. 535, 2019.

KRUG, H.; KRAEGELOH, A. **Special issue on “future nanosafety”.** *Chemical Research in Toxicology*, v. 33, n. 5, p. 1037–1038, 2020.

LAI, D. Y. **Approach to using mechanism-based structure activity relationship (SAR) analysis to assess human health hazard potential of nanomaterials.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 85, p. 120–126, 2015.

LAI, R. W. S. et al. **Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions.** 2017.

LAMON, L. et al. **Grouping of nanomaterials to read-across hazard endpoints: a review.** *Nanotoxicology*, v. 13, n. 1, p. 100–118, 2019.

LANDSIEDEL, R. et al. **Toxico/biokinetics of nanomaterials.** *Archives of Toxicology*, v. 86, n. 7, p. 1021–1060, 2012.

LEE, S. B. **Nanotoxicology: Toxicity and biological effects of nanoparticles for new evaluation standards.** *Nanomedicine*, v. 6, n. 5, p. 759–761, 2011.

LEHR, C. M. et al. **Biological barriers - A need for novel tools in nanotoxicology and nanomedicine.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 77, n. 3, p. 337, 2011.

LI, Y.; BORASCHI, D. **Erratum: Endotoxin contamination: A key element in the interpretation of nanosafety studies ((Nanomedicine (2016) 11:3 (269-287)).** *Nanomedicine*, v. 11, n. 6, p. 739, 2016.

LI, Y.; FUJITA, M.; BORASCHI, D. **Endotoxin contamination in nanomaterials leads to the misinterpretation of immunosafety results.** *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. MAY, p. 1–7, 2017.

LIN, H. et al. **Current Methods and Research Progress in Nanomaterials Risk Assessment.** *Current Drug Metabolism*, v. 13, n. 4, p. 354–363, 2012.

LINKOV, I.; SATTERSTROM, F. K.; COREY, L. M. **Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 4, n. 2, p. 167–171, 2008.

LISON, D.; VIETTI, G.; VAN DEN BRULE, S. **Paracelsus in nanotoxicology.** *Particle and Fibre Toxicology*, v. 11, n. 1, p. 1–4, 2014.

LIU, Y.; WORKALEMAHU, B.; JIANG, X. **The Effects of Physicochemical**

Properties of Nanomaterials on Their Cellular Uptake In Vitro and In Vivo. *Small*, v. 13, n. 43, p. 1–13, 2017.

LOCKWOOD, C.; TRICCO, A. C. **Preparing scoping reviews for publication using methodological guides and reporting standards.** *Nursing and Health Sciences*, v. 22, n. 1, p. 1–4, 2019.

LÓPEZ-ALONSO, C.; GARCÍA-CAMBERO, J. P. **Informatic resources useful for the development of biomedical applications of nanomaterials and their toxicological evaluation.** *Revista de Toxicología*, v. 31, n. 1, p. 23–30, 2014.

LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. J. **Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública.** *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, v. 31, n. 2, p. 188–200, 2013.

LUTHER, W. **Industrial Application of Nanomaterials – Chances and Risks.** Düsseldorf: **Future Technologies Division of VDI Technologiezentrum GmbH**, 2004.

LV, M. et al. **Metabolomics techniques for nanotoxicity investigations.** *Bioanalysis*, v. 7, n. 12, p. 1527–1544, 2015.

MAGDOLENOVA, Z. et al. **Mechanisms of genotoxicity.** A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, v. 8, n. 3, p. 233–278, 2014.

MAHTO, S. K. et al. **Microfluidic platforms for advanced risk assessments of nanomaterials.** *Nanotoxicology*, v. 9, n. 3, p. 381–395, 2014.

MANSOORI, G. A.; SOELAIMAN, T. A. F. **Nanotechnology - An Introduction for the Standards Community.** *Journal of ASTM International*, v. 2, n. 6, p. 17–38, 2005.

MAOJO, V. et al. **Nanoinformatics: A new area of research in nanomedicine.** *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3867–3890, 2012.

MARCHESE ROBINSON, R. L. et al. **How should the completeness and quality of curated nanomaterial data be evaluated?** *Nanoscale*, v. 2019- Novem, 2016.

MIERNICKI, M. et al. **Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions.** *Nature Nanotechnology*, v. 14, n. 3, p. 208–216, 2019.

MILOSEVIC, A.; ROMEO, D.; WICK, P. **Understanding Nanomaterial Biotransformation: An Unmet Challenge to Achieving Predictive Nanotoxicology.** *Small*, v. 16, n. 36, p. 1–5, 2020.

MITRANO, D. M. et al. **Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products.** *Environment International*, v. 77, p. 132–147, 2015.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A. et al. **Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, v. 234: 222-235.

MUSAZZI, U. M. et al. **Is the European regulatory framework sufficient to assure the safety of citizens using health products containing nanomaterials?** *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 6, p. 870–882, 2017.

MYERS, D. K. et al. **From in vivo to in vitro: The medical device testing paradigm shift.** *Altex*, v. 34, n. 4, p. 479–500, 2017.

MYLLYNNEN, P. **Damaging DNA from a distance.** *Nature Nanotechnology*, v. 4, n. 12, p. 795–796, 2009.

NAVYA, P. N.; DAIMA, H. K. **Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives.** *Nano Convergence*, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2016.

NEAGU, M. et al. **Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology.** *Archives of Toxicology*, v. 91, n. 3, p. 1031–1048, 2017.

Applications: State of the Art in Materials and Devices Nanostructure, Nanosystems, and Nanostructured Materials: Theory, Production and Development. Bilthoven: [s.n.].

SAIFI, M. A.; KHAN, W.; GODUGU, C. **Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles.** *Pharmaceutical Nanotechnology*, v. 6, n. 1, p. 3–16, 2018.

SAJI, V. S.; CHOE, H. C.; YEUNG, K. W. K. **Nanotechnology in biomedical applications: a review.** *Int. J. Nano and Biomaterials*, v. 3, 2010.

SAVOLAINEN, K. et al. **Nanosafety in Europe 2015–2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations,** Finnish Institute of Occupational Health. [s.l.] Finnish Institute of Occupational Health, 2013.

SAYES, C. M., and WARHEIT, D. B. **Characterization of nanomaterials for toxicity assessment.** *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1, 660–70. 2009.

SCCS, S. C. ON C. S. **Guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics** *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP. Brussels: [s.n.].

SCENIHR. **Risk Assessment of Products of Nanotechnologies.** n. 19 January, p. 71, 2009.

SCENIHR. **Guidance on the Determination of Potential Health Effects of Nanomaterials Used in Medical Devices.** Brussels, Belgium: **European Commission**, 2015. Disponível em: <<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/e9899821-e4d4-4ceb-aada-0c62ce6cfc3/language-en>>

SCHWARZ, H. ; SCMITTNER, M.; DUSCHL, A. ; HOREJS-HOECK, J. **Residual Endotoxin Contamination in Recombinant Proteins are suficiente to activate human CD1c dendritic cells.** *PLoS One*, 2014, 9, e113840.

SENADO NOTÍCIAS. **Marco Legal da Nanotecnologia é aprovado na CCJ.** Disponível em: <<https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2020/02/19/marco-legal-da-nanotecnologia-avanca>>. Acesso em: 24 out. 2020.

SHANNAHAN, J. **The biocorona: A challenge for the biomedical application of nanoparticles.** *Nanotechnology Reviews*, v. 6, n. 4, p. 345–353, 2017.

SHATKIN, J. A. **The Future in Nanosafety.** *Nano Letters*, v. 20, n. 3, p. 1479–1480, 2020.

SHATKIN, J. A.; ONG, K. J. **Alternative Testing Strategies for Nanomaterials: State of the Science and Considerations for Risk Analysis.** *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, v. 36, n. 8, p. 1564–1580, 2016.

SHIEKH, F. A. et al. **For (nano) rules and regulations: The learning curve.** *Nanomedicine*, v. 15, n. 23, p. 2225–2228, 2020.

SHINDE, R. B. et al. **State-of-Art Bio-Assay Systems and Electrochemical Approaches for Nanotoxicity Assessment.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. April, p. 1–15, 2020.

SHVEDOVA, A. A.; KAGAN, V. E.; FADEEL, B. **Close encounters of the small kind: Adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 50, p. 63–88, 2010.

SHVEDOVA, A.; PIETROIUSTI, A.; KAGAN, V. **Nanotoxicology ten years later: Lights and shadows.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 299, n. 2015, p. 1–2, 2016.

SIEGRIST, S. et al. **Preclinical hazard evaluation strategy for nanomedicines.** *Nanotoxicology*, v. 13, n. 1, p. 73–99, 2019.

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

SOARES, S. et al. **Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues.** *Frontiers in Chemistry*, v. 6, n. AUG, p. 1–15, 2018.

SOLAIMAN, S. M. et al. **Nanotechnology and its medical applications: Revisiting public policies from a regulatory perspective in Australia.** *Nanotechnology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 255–269, 2017.

SOM, C. et al. **Toward the development of decision supporting tools that can be used for safe production and use of nanomaterials.** *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 3, p. 863–872, 2012.

STONE, V.; JOHNSTON, H.; SCHINS, R. P. F. **Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological Considerations.** *Critical Reviews in Toxicology*, v. 39, n. 7, p. 613–626, 2009.

TANTRA, R. et al. **Nano(Q)SAR: Challenges, pitfalls and perspectives.** *Nanotoxicology*, v. 9, n. 5, p. 636–642, 2015.

TANTRA, R. et al. **Suitability of analytical methods to measure solubility for the purpose of nanoregulation.** *Nanotoxicology*, v. 10, n. 2, p. 173–184, 2016.

TEUNENBROEK, T. VAN; DIJKZEUL, A.; BAKE, J. **The ProSafe White Paper - Towards a more effective and efficient governance and regulation of nanomaterials.** 2017.

THE JOANNA BRIGGS INSTITUTE. **The Joanna Briggs Institute Reviewers' Manual 2015: Methodology for JBI scoping reviews.** Joanne Briggs Institute, p. 1–24, 2015.

THE UNITED STATES OF AMERICA. **National Nanotechnology Initiative - Strategic Plan** National Science and Technology Council. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nano.gov>>.

TINKLE, S. et al. **Nanomedicines : Addressing the Scientific and Regulatory gap.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, p. 1–22, 2014.

TRICCO, A. C. et al. **A scoping review on the conduct and reporting of scoping reviews.** *BMC Medical Research Methodology*, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.

USFDA. **Nanotechnology - A Report of the U. S. Food and Drug Administration Nanotechnology Task Force** Department of Health & Human Services. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanotechnology:+A+Report+of+the+U.S.+Food+and+Drug+Administration+Nanotechnology+Task+Force#7>>.

USFDA. **Nanotechnology: A report of the U.S. food and drug administration. Nanotechnology Considerations for the EPA and FDA**, p. 109–154, 2007.

USFDA. **Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology** Biotechnology Law Report. [s.l: s.n.].

USFDA. **Guidance for Industry - Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products.** [s.l: s.n.].

USFDA. **Guidance for Industry on Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials (Draft Guidance).** FDA, n. December, 2017.

USFDA. **Guidance for Industry - Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation.** FDA. [s.l: s.n.].

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T. **Engineered nanomaterials for pharmaceutical and biomedical products new trends, benefits and opportunities.** *Pharm. Bioprocess.*, v. 4, n. 1, p. 13, 2016.

VAN DER ZANDE, M.; VANDERBRIEL, R. J.; VAN DOREN E.; KRAMER, E.; HERRERA RIVIERA, Z.; SERRANO-ROJERO, C.S. **Distribution, Elimination and Toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure.** *ACS Nano*, 2012, 6 pp. 7427-7442

WACKER, M. G.; PROYKOVA, A.; SANTOS, G. M. L. **Dealing with nanosafety around the globe - Regulation vs. innovation.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.

509, n. 1–2, p. 95–106, 2016.

WANG, J. et al. **Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance.** *Science of the Total Environment*, v. 442, n. 2013, p. 56–62, 2012.

WARHEIT, D. B. **Hazard and risk assessment strategies for nanoparticle exposures: How far have we come in the past 10 years?.** *F1000Research*, v. 7, n. 0, p. 1–14, 2018.

WARHEIT, D. B.; DONNER, E. M. **How meaningful are risk determinations in the absence of a complete dataset?** Making the case for publishing standardized test guideline and “no effect” studies for evaluating the safety of nanoparticulates versus spurious “high effect” results from single. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 16, n. 3, 2015.

WESTMEIER, D.; STAUBER, R. H.; DOCTER, D. **The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM).** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 299, p. 53–57, 2015.

WINKLER, D. A. et al. **Applying quantitative structure–activity relationship approaches to nanotoxicology:** Current status and future potential. *Toxicology*, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2012.

WINKLER, D. A. **Recent advances, and unresolved issues, in the application of computational modelling to the prediction of the biological effects of nanomaterials.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 299, p. 96–100, 2016.

WOLFRAM, J. et al. **The nano-plasma interface:** Implications of the protein corona. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2014.

WU, T.; TANG, M. **Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs.** *Journal of Applied Toxicology*, v. 38, n. 1, p. 25–40, 2018.

XIARCHOS, I. et al. **Nanocharacterization, Materials Modeling, and Research Integrity as Enablers of Sound Risk Assessment:** Designing Responsible Nanotechnology. *Small*, v. 16, n. 36, p. 18–22, 2020.

YANG, W. et al. **Nanoparticle Toxicology.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 61, p. 269–289, 2020.

ZIELIŃSKA, A. et al. **Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and testing at a glance.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 13, p. 1–22, 2020.

9 APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A – PROTOCOLO DA REVISÃO DE ESCOPO

OSF REGISTRATION – PROTOCOL

Registration DOI: [10.17605/OSF.IO/C9BZF](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/C9BZF)

(December 7th, 2020)

The regulatory challenges in the biological evaluation of nanotechnology-based medical devices under a risk management perspective: a scoping review

Summary

This is a scoping review protocol designed to compose a master's degree thesis. The purpose of this scoping review is to map and assess the available literature regarding biological evaluation of nanotechnology based medical devices under a risk management perspective, in order to support the proposal of a general regulatory guidance for this product category in Brazil, taking into account the challenges imposed by specificities of this enabling technology in the health field and the existing knowledge gaps.

1. Background:

As nanotechnology is an enabling technology with potential to be applied in a wide variety of fields, it has aroused interest, hopes, but also concerns in the health field due to both its potential to solve unresolved medical issues, and the risks related to their biological safety and the countless uncertainties related to its behavior at the biological interface and its consequences in long term.

In this sense, the emergence of nanotoxicology, as a fundamental science to understand the nanosafety in nanomedicine context, associated with the growing development of nanotechnology-based medical devices have highlighted the importance of mapping the available knowledge in these fields to better structure and address the regulatory approach applied to this new category of medical devices.

Being the literature about those topics disperse and diverse, the adoption of a broad and somewhat systematic review to provide an overview of existing evidence (regardless of its quality), such that provided by Scoping Reviews, was considered as the most appropriated strategy to guide the objectives proposed for this project.

2. Objective:

The purpose of this scoping review is to map and assess the available literature regarding biological evaluation of nanotechnology based medical devices under a risk management perspective, in order to support the proposal of a general regulatory guidance for this product category in Brazil, taking into account the challenges imposed by specificities of this enabling technology in the health field and the existing knowledge gaps.

3. Questions:

3.1. Main Question:

- How does the biological evaluation of nanotechnology-based medical devices differ from regular evaluation performed for medical devices in general?

3.2. Secondary Questions:

- Which are the challenges involved in biological evaluation of nanotechnology-based medical devices?

- How they have been addressed?

- How the biological evaluation of nanotechnology-based medical devices has advanced to overcome inherent challenges and difficulties in this context?

4. Eligibility Criteria:

The inclusion and exclusion criteria proposed for this scoping review are not strict due to the purpose and nature of the project.

- Inclusion criteria: unrestricted publications related to nanotechnology-based medical devices with focus on "general health care materials", regulation, biological safety evaluation and/or biological risk management applied to nanotechnology-based medical devices. Furthermore, general publications related to these topics (even if not especially related to medical devices) will also be considered for their potential to subsidize a knowledge still under construction in this field.

- Exclusion criteria: publications related to equipments and in vitro diagnostic products, as those medical devices categories are out of the scope of this project, as well as those borderline nanomedicines, whose classification is not well established yet. Furthermore, publications in languages other than Portuguese, English or Spanish will be disregarded.

It should be noted that prior to this scoping review protocol registry, preliminary researches were conducted to identify possible scoping reviews related to this study topic. These

were carried out on December 6th, 2020 by the PubMed and Cochrane Library databases, using the terms (((("nanotechnology 138669"[All Fields]))) AND ("medical devices"[All Fields])) AND ("regulation"[All Fields])) AND ("scoping review"[All Fields]); and (((nanotechnology) AND (medical devices)) AND (regulation)) AND (safety management)) AND (scoping review), respectively. No results were found.

5. Search Strategy:

Regarding the search strategy, in order to be comprehensive in identifying the available literature on the topic, it will be implemented in at least two database of general scope, such as PubMed, Cochrane Lybrary, Embase, Scopus - to be defined.

Considering the extention of possible applicable terms, the appropriate search strategy will just be defined after a reasonable evaluation of its feasibility as a unique block of terms or searching groups (by macrothems related to regulation, biological evaluation and risk management of nanotechnology-based medical devices).

6. Extraction of the Results:

The data extraction will be processsed after publication selection process (based on established inclusion and exclusion criteria).

7. Presenting Results:

A flowchart will detail the review decision process, indicating the results from the search, removal of duplicate citations, study selection, full retrieval and potential additions.

The narrative summary of findings will be structured and presented as a charting table to record the key information of selected sources, such as authorship, year of publication, publication title, journal/impact factor, relevant findings to the review questions. This content can be reviewed and refined during the data evaluation, if necessary.

8. Discussion, Conclusion and Future Implications:

The results will be discussed in the context of current literature, being the conclusions presented accordingly to review questions.

As for implications, some recommendations may be done for future researches based on the knowledge gaps identified and prospects for advancement in the area.

9.2 APÊNDICE B – MOTIVOS DE EXCLUSÃO DOS ARTIGOS SELECIONADOS PARA LEITURA NA ÍNTEGRA

Ordem	Ano	Autoria	Título	Revista	Motivação
1.	2020	ABDELSATTAR AS, DAWOUD A, HELAL MA.	<i>Interaction of nanoparticles with biological macromolecules: a review of molecular docking studies</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - especificidade e finalidade. Visão geral sobre a realização de estudos tipo <i>docking</i> com NP específicas (TiO ₂ , CuO, Fe ₃ O ₄ , Ag, Au, ZnO, Mn ₂ O ₃ , C ₆₀ , graphene) para predição de sua interação com as macromoléculas biológicas e potencial toxicidade. Técnica de estudo de comportamento biológico relativamente nova.
2.	2015	ALEXIOU C, FADEEL B.	<i>Editorial: Brave new world - Focus on nanomedicine</i>	Biochem Biophys Res Commun	Fora de escopo - Aborda a nanomedicina com enfoque em nanomedicamentos.
3.	2020	ALEYA L, ABDEL-DAIM MM.	<i>Advances in nanotechnology, nanopollution, nanotoxicology, and nanomedicine</i>	Environ Sci Pollut Res Int	Fora de escopo - maior enfoque em nanopoluição, tendo as raras menções relacionadas a nanotoxicidade sido direcionadas a NP específicas e em abordagem desconexa com a temática do trabalho.
4.	2020	BANNUSCHER A, et al.	<i>Metabolomics profiling to investigate nanomaterial toxicity in vitro and in vivo</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - especificidade. Estudo realizado com nanopartículas de SiO ₂ em modelo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (inalação).
5.	2018	BASTÚS NG, PUNTES V.	<i>Nanosafety: Towards Safer Nanoparticles by Design</i>	Curr Med Chem	Fora de escopo - especificidade. Apresenta o recente desenvolvimento de novas estratégias de nanosseguurança com vistas ao endereçamento do conceito " <i>safe-by-design</i> " para otimização de performance e segurança. Abordagem voltada a NP inorgânicas.
6.	2019	BETTAZZI F, PALCHETTI I	<i>Nanotoxicity assessment: A challenging application for cutting edge electroanalytical tools</i>		Fora de escopo – especificidade. Detalhamento das vias de sinalização toxicológica molecular aprofundado para contextualização de abordagens eletroquímicas aplicadas em avaliações <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
7.	2012	BOHNSACK JP, ASSEMI S, MILLER JD, FURGESON DY.	<i>The primacy of physicochemical characterization of nanomaterials for reliable toxicity assessment: a review of the zebrafish nanotoxicology model</i>	Methods Mol Biol	Fora de escopo - especificidade e finalidade. Artigo de revisão baseado em coletânea de estudos nanotoxicológicos envolvendo NM específicos como nanotubos de carbono, fulerenos, ouro, cobre, metais pesados, prata, óxidos metálicos, dendrímeros - a partir do modelo <i>zebrafish</i> .
8.	2011	BOSETTI R, VEREECK L.	<i>Future of nanomedicine: obstacles and remedies</i>	Nanomedicine (Lond)	Fora de escopo - abordagem voltada essencialmente para nanomedicamentos.
9.	2017	BREHM M, ET AL.	<i>An Integrated Data-Driven Strategy for Safe-by-Design Nanoparticles: The FP7 MODERN Project</i>	Adv Exp Med Biol	Fora de escopo - finalidade e especificidade. Abordagem relacionada à plataforma/biblioteca MODERN - relacionada ao projeto FP7 da Comissão Europeia que dispõe sobre dados e modelo computacional (QNAR) direcionados a NP metálicas e de óxidos metálicos.
10.	2015	BRUININK A, WANG J, WICK P.	<i>Effect of particle agglomeration in nanotoxicology</i>	Arch Toxicol	Fora de escopo - temática ambiental e especificidade. Abordagem voltada à discussão de aglomerados de ENPs no meio ambiente e sua toxicidade no organismo humano, quando capturados por exposição aérea ou gastrointestinal (por ingestão).
11.	2011	BURELLO E, WORTH A.	<i>Computational nanotoxicology: Predicting toxicity of nanoparticles</i>	Nat Nanotechnol	Fora de escopo - relacionado ao desenvolvimento e validação de modelo QSAR aplicado à avaliação de citotoxicidade de NP de óxido metálico - especificidade das propriedades e descritores utilizados.
12.	2018	BYRNE HJ, MUKHERJEE SP, NAHA PC.	<i>Nano-Bio Interactions: Nanomedicine and Nanotoxicology</i>	Int J Environ Res Public Health	Fora de escopo - especificidade e temática. Editorial dedicado à descrição de artigos relacionados à compreensão das nanobiointerações deflagradas por NM específicos, bem como aquelas observadas no meio ambiente.

13.	2019	CAI R, CHEN C.	<i>The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine</i>	Adv Mater	Fora de escopo – temática e especificidade. Abordagem voltada a nanomedicamentos.
14.	2016	CASMAN EA, GERNAND JM.	<i>Nanotoxicology: Seeing the trees for the forest</i>	Nat Nanotechnol	Fora de escopo - especificidade (pontos quânticos de cadmio).
15.	2014	CHANG XL, YANG ST, XING G.	<i>Molecular toxicity of nanomaterials</i>	J Biomed Nanotechnol	Fora de escopo - especificidade. Mecanismos e aspectos relacionados a toxicidade de NMs a partir de experiências/avaliações de NM específicos, o que compromete extrapolações gerais.
16.	2013	CHEN C, LI YF, QU Y, CHAI Z, ZHAO Y.	<i>Advanced nuclear analytical and related techniques for the growing challenges in nanotoxicology</i>	Chem Soc Rev	Fora de escopo - compreensão geral de técnicas analíticas nucleares aplicadas à caracterização de NM, quantificação de biodistribuição, bioacumulação e transformação de NM <i>in vivo</i> .
17.	2018	CHEN S, LIANG XJ.	<i>Nanobiotechnology and nanomedicine: small change brings big difference</i>	Sci China Life Sci	Fora de escopo - abordagem geral sobre nanotecnologia e sua aplicação à área médica.
18.	2019	CHETWYND AJ, WHEELER KE, LYNCH I.	<i>Best practice in reporting corona studies: Minimum information about Nanomaterial Biocorona Experiments (MINBE)</i>	Nano Today	Fora de escopo – temática. Enfoque ao relatório de informações mínimas sobre experimentos para análise de biocorona.
19.	2013	CLIFT MJ, ET AL.	<i>Can the Ames test provide an insight into nano-object mutagenicity? Investigating the interaction between nano-objects and bacteria</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - estudo destinado à avaliação de um grupo de NP bem caracterizadas submetidas ao teste de AMES, cuja não aplicabilidade a NM encontra-se bem definida.
20.	2013	COHEN J, DELOID G, PYRGIOTAKIS G, DEMOKRITOU P.	<i>Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - finalidade e especificidade. Propõe protocolo de dispersão padronizado e funções dosimétricas empíricas a partir de ENM metálicos ou óxido metálicos em pó, com vistas a viabilizar preparações reprodutíveis e consistentes de suspensões de ENM monodispersas e estabilizadas, bem como estimativa de entrega de dose de NPs às células como uma função do tempo.
21.	2014	COHEN JM, TEEGUARDEN JG, DEMOKRITOU P.	<i>An integrated approach for the in vitro dosimetry of engineered nanomaterials</i>	Part Fibre Toxicol	Fora de escopo - finalidade. Apresentação de metodologia integrada para dosimetria de NP <i>in vitro</i> derivada, como ferramenta para determinação e relato de dose entregue às células. Metodologia baseada no parâmetro de aglomeração. Apresentados cálculos numéricos para deposição de partícula ao longo do tempo, validados para 20 NP metálicas e de óxido metálicos em uma variedade de condições <i>in vitro</i> para auxiliar nanotoxicologistas nas questões de dosimetria em seus estudos de triagem.
22.	2017	CONCU R, KLEANDROVA VV, SPECK-PLANCHE A, CORDEIRO MNDS.	<i>Probing the toxicity of nanoparticles: a unified in silico machine learning model based on perturbation theory</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - temática e diversidade de sistemas biológicos avaliados (predominantemente voltados à ecotoxicidade) = modelo QSTR baseado na teoria da perturbação para predição de perfis toxicológicos múltiplos de diversos NM sob condições experimentais diversas e baseado em métodos de análise não linear (redes neurais artificiais).
23.	2006	CURTIS J, GREENBERG M, KESTER J,	<i>Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians</i>	Toxicol Rev	Fora de escopo - abordagem geral sobre nanotecnologia, alguns nanomateriais (enquanto produtos primários da nanotecnologia), aplicações biomédicas (biosensores, imageamento e <i>drug delivery</i>), vias de exposição

		PHILLIPS S, KRIEGER G			e toxicidade (inalatoria, dermica, gastrointestinal) a partir de NM específicos, antigenicidade de NM de carbono, questões regulatórias ambientais.
24.	2013	DARABI SAHNEH F, SCOGLIO C, RIVIERE J.	<i>Dynamics of nanoparticle-protein corona complex formation: analytical results from population balance equations</i>	PLoS One	Fora de escopo - temática e finalidade. Apresentação de uma extensão de modelo desenvolvido por Dell'Orco et al. para avaliação de dois pontos de equilíbrio no processo de formação da proteína corona (hard), a partir da composição e tempo de processo.
25.	2016	DAVID CA, OWEN A, LIPTROTT NJ.	<i>Determining the relationship between nanoparticle characteristics and immunotoxicity: key challenges and approaches</i>	Nanomedicine (Lond)	Fora de escopo - especificidade. Abordagem relacionada a nanomedicamentos.
26.	2013	DAWSON KA, ANGUSSOLA S, LYNCH I.	<i>The need for in situ characterisation in nanosafety assessment: funded transnational access via the QNano research infrastructure</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - temática e finalidade. Breve contextualização do acesso transnacional financiado pelo projeto QNano - que fornece infraestrutura de pesquisa analítica para caracterização de NMs, ressaltando a importância e impacto dos meios de cultura na determinação do comportamento das NPs.
27.	2017	DELOID GM, COHEN JM, PYRGIOTAKIS G, DEMOKRITOU P.	<i>Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials</i>	Nat Protoc	Fora de escopo - finalidade (protocolo) e especificidade (NM em suspensão, sendo também limitado a NM com taxa de aspecto relativamente baixa).
28.	2015	DELOID GM, et al.	<i>Advanced computational modeling for in vitro nanomaterial dosimetry</i>	Part Fibre Toxicol	Fora de escopo - especificidade e finalidade Apresenta modelos computacional de transporte para estimativa de dosimetria de ENM relevantes de óxido metálico suspensas em meio de cultura.
29.	2021	DEMIR E.	<i>A review on nanotoxicity and nanogenotoxicity of different shapes of nanomaterials</i>	J Appl Toxicol	Fora de escopo - especificidade. Relacionado a avaliação de nanotoxicidade, com enfoque no formato de NM metálicos não-magnéticos, magnéticos e semicondutores - especificamente nanofios, nanobastões e nanoesferas quanto a efeitos formato-dependentes.
30.	2020	DUAN Y et al.	<i>Prediction of protein corona on nanomaterials by machine learning using novel descriptors</i>	NanoImpact	Fora de escopo - especificidade temática. Abordagem direcionada à apresentação de modelo de predição de proteína corona formada em matrizes biológicas contendo vários tipos de nanomateriais engenheirados (metálicas, a base de celulose e NM bidimensionais) e uma série de proteínas para interação, a partir de algoritmo de <i>machine learning</i> .
31.	2011	DUARTE IF.	<i>Following dynamic biological processes through NMR-based metabonomics: a new tool in nanomedicine?</i>	J Control Release	Fora de escopo - especificidade e temática (nanomedicamentos). Abordagem geral sobre metabologênica, técnicas reconhecidas, sua incipiente aplicação no contexto de nanoformulações desenhadas para entrega de droga (farmacogenômica), e em contextos de aplicação de nanomateriais sozinhos ou combinados com agentes biológicos ativos.
32.	2015	DUSINSKA M, TRAN L.	<i>NanoTEST in a Nutshell</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - finalidade: apresentação de 13 artigos que utilizaram os pressupostos do projeto NanoTEST como base para condução de diversos estudos de toxicidade de NP específicas.
33.	2018	DWIVEDI S, et al.	<i>Toxicogenomics: A New Paradigm for Nanotoxicity Evaluation</i>	Adv Exp Med Biol	Fora de escopo - especificidade temática. Abordagem direcionada à aplicabilidade do método e resultados obtidos a partir de avaliações de nanomateriais específicos.

34.	2017	ELLIOTT JT, et al.		<i>Toward achieving harmonization in a nano-cytotoxicity assay measurement through an interlaboratory comparison stud</i>	ALTEX	Fora de escopo - especificidade (NP de poliestireno).
35	2012	EPA VC, et al.		<i>Modeling biological activities of nanoparticles</i>	Nano Lett	Fora de escopo - especificidade. Avaliação dos desfechos de captura celular e indução de apoptose a partir de NP de óxido metálico em vários tipos celulares.
36.	2010	ESCH RK, HAN L, FOARDE KK, ENSOR DS.		<i>Endotoxin contamination of engineered nanomaterials</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - especificidade. Contaminação por endotoxina avaliada em nanomateriais engeneirados específicos (a base de carbono) a partir de protocolo desenhado para suas especificidades, tendo algumas características físicas sido utilizadas para avaliar eventual correlação entre as referidas propriedades e o grau de adsorção de endotoxinas para compreensão de fatores potencialmente determinantes a essa contaminação.
37.	2020	FADEEL ALEXIOU C.	B,	<i>Brave new world revisited: Focus on nanomedicine</i>	Biochem Biophys Res Commun	Fora de escopo - especificidade e temática. Revisão em Nanomedicina concernente às publicações dos últimos 5 anos - voltados à aplicação em nanomedicamentos, tratamentos direcionados ao tratamento de câncer, uso de partículas superparamagnéticas, NP teranósticas.
38.	2019	FADEEL B.		<i>Hide and Seek: Nanomaterial Interactions With the Immune System</i>	Front Immunol	Fora de escopo - especificidade. Abordagem direcionada à resposta imunológica deflagrada ou não por nanomedicamentos, conforme finalidade desejada.
39.	2008	FAUNCE TA, WHITE J, MATTHAEI KI.		<i>Integrated research into the nanoparticle-protein corona: a new focus for safe, sustainable and equitable development of nanomedicines</i>	Nanomedicine (Lond)	Fora de escopo - amplitude e inespecificidade da discussão relacionada à proteína corona, construída a partir de observações de comportamento de NP específicas avaliadas sob condições de mimetização do ambiente biológico <i>in vitro</i> .
40.	2016	FERRARO D, et al.		<i>Overestimation of nanoparticles-induced DNA damage determined by the comet assay</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - especificidade. Avaliação de genotoxicidade superestimada pelo ensaio do cometa (modificado - uso de núcleos isolados ao invés de células inteiras) a partir de NP de CeO ₂ , TiO ₂ , SiO ₂ e poliestireno.
41.	2010	FUBINI GHIAZZA FENOGLIO I.	B, M,	<i>Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - Discussão baseada em práticas e construída a partir de exemplificação de NP, nanofibras ou partículas ultrafinas específicas não aplicáveis ao contexto biomédico ou sob contextos de exposição pulmonar.
42.	2020	FURXHI I, et al.		<i>Nanotoxicology data for in silico tools: a literature review</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - abordagem descritiva de publicações relacionadas à predição aplicada à nanotoxicologia. Traz uma visão geral relacionada à predição aplicada ao campo da nanotoxicologia a partir de ferramentas de <i>machine learning</i> . Apresentada caracterização das publicações recuperadas em algumas bases de dados (mapeamento de suas principais características no que tange às NP avaliadas, tipos de sistemas, espécies, linhagens celulares, algoritmos utilizados).
43.	2020	FURXHI I, et al.		<i>Practices and Trends of Machine Learning Application in Nanotoxicology</i>	Nanomaterials (Basel)	Fora de escopo - abordagem não relacionada à temática e finalidade do projeto. Fornece uma revisão de passos sequenciados para implementação do modelo de <i>machine learning</i> .

44.	2013	GARCÍA-REMESAL M, et al.	<i>Using nanoinformatics methods for automatically identifying relevant nanotoxicology entities from the literature</i>	Biomed Res Int	Fora de escopo - pesquisa do tipo prova de conceito relacionada ao desenvolvimento de abordagem de nanoinformática baseada em técnicas de reconhecimento de entidade (como NP, rotas de exposição, efeitos tóxicos e alvos) para extração automática de entidades relacionadas a nanotoxicologia a partir da literatura.
45.	2014	GEBEL T, et al.	<i>Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment</i>	Arch Toxicol	Fora de escopo - abordagem ampla e pouco aplicável ao escopo do projeto. Categorização proposta a partir de características pouco aplicáveis ao campo de estudo (relacionadas a NM de exposição ocupacional/por inalação), sendo portanto pouco útil à avaliação de risco necessária.
46.	2010	GERACI CL, CASTRANOVA V.	<i>Challenges in assessing nanomaterial toxicology: a personal perspective</i>	Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol	Fora de escopo - temática e especificidade. Aborda aspectos relacionados à avaliação de risco no contexto de exposição pulmonar em ambiente de trabalho.
47.	2015	GODWIN H, et al.	<i>Nanomaterial categorization for assessing risk potential to facilitate regulatory decision-making</i>	ACS Nano	Fora de escopo - especificidade e temática. Versa sobre estratégias para agrupamento de nanomateriais (árvores de decisão, triagem de alto rendimento ou conteúdo) aplicadas no âmbito ambiental e de exposição ocupacional, abordadas de modo exemplificativo, a partir de nanotubos de carbono para predição de perigos e riscos no contexto regulatório de tomada de decisão baseada em avaliação de risco.
48.	2015	GUADAGNINI R, et al.	<i>Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - Avaliação quanto à interferência de um painel de NP específicas (PLGA-PEO, TiO ₂ , SiO ₂ , Fe ₃ O ₄ NPs) a partir de vários ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> .
49.	2016	GUNSOLUS IL, HAYNES CL.	<i>Analytical Aspects of Nanotoxicology</i>	Anal Chem	Fora de escopo - abordagem muito específica para a finalidade e utilização de métodos analíticos destinados à caracterização de nanomateriais e alguns desfechos de toxicidade não contemplados na ISO 10993-1 - referência para análise de segurança biológica de dispositivos médicos.
50.	2020	HALAPPANAVAR S, et al.	<i>Adverse outcome pathways as a tool for the design of testing strategies to support the safety assessment of emerging advanced materials at the nanoscale</i>	Part Fibre Toxicol	Fora de escopo - especificidade. Fornece uma visão geral sobre a estrutura de AOP (vias de resultados adversos), com enfoque em AOPs (em desenvolvimento) relacionados à toxicidade inalatória induzida por NMs.
51.	2014	HAMMAD S, ABDOU AM, OMAR MA.	<i>Gebel-criteria for risk assessment in nanotoxicology</i>	EXCLI J	Fora de escopo - especificidade temática. Apresenta <i>Gebel-criteria</i> como novo conceito de avaliação de risco em nanotoxicologia a partir da classificação do nanomaterial em 3 categorias, sendo duas delas relacionadas a materiais respiráveis (exposição por inalação).
52.	2015	HASTINGS J, et al.	<i>eNanoMapper: harnessing ontologies to enable data integration for nanomaterial risk assessment</i>	J Biomed Semantics	Fora de escopo - finalidade. Apresentação do desenvolvimento e estruturação do <i>eNanoMapper</i> , enquanto ontologia para agregar dados de segurança de nanomateriais.
53.	2014	HRISTOZOV DR, et al.	<i>A weight of evidence approach for hazard screening of engineered nanomaterials</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - Finalidade. Estudo de caso ilustrativo para apresentação e demonstração de estrutura desenvolvida para identificação de perigos e

					tomada de decisão a partir de uma abordagem MCDA quantitativa do tipo peso de evidência.
54.	2016	HU X, LI D, GAO Y, MU L, ZHOU Q.	<i>Knowledge gaps between nanotoxicological research and nanomaterial safety</i>	Environ Int	Fora de escopo - temática e especificidade. Abordagem mais direcionada para temática ambiental, tendo a revisão de literatura abarcado nanomateriais específicos,
55.	2017	HUANG YW, CAMBRE M, LEE HJ.	<i>The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms</i>	Int J Mol Sci	Fora de escopo - especificidade. Abordagem voltada à avaliação de 4 propriedades de nanomateriais óxido metálicos usados em várias aplicações industriais, constituídos a partir de 7 elementos químicos (Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu e Zn) - e sua repercussão sobre a citotoxicidade.
56.	2011	HUBBS AF, et al	<i>Nanotoxicology--a pathologist's perspective</i>	Toxicol Pathol	Fora de escopo - finalidade. Abordagem voltada a exposição dos efeitos sistêmicos relacionados as NP no organismo humano e sua visualização histopatológica. Enfoque à via de exposição por inalação, exposição ocupacional + alcance e efeitos sobre os sistemas cardiovascular e nervoso.
57.	2013	HUBBS AF, et al.	<i>Nanotechnology: toxicologic pathology</i>	Toxicol Pathol	Fora de escopo - finalidade. Aborda de modo amplo e compreensivo a distribuição e transporte de NP pelo corpo, pelas diferentes vias de exposição, assim como seu alcance a diferentes as vias intracelulares.
58.	2013	HUNT G, et al.	<i>Towards a Consensus View on Understanding Nanomaterials Hazards and Managing Exposure: Knowledge Gaps and Recommendations</i>	Materials (Basel)	Fora de escopo - finalidade e especificidade. Fornece uma visão geral de aspectos relacionados à nanosseguurança, a partir da percepção de <i>experts</i> envolvidos no projeto NanoImpactNet, com maior enfoque ao ambiente de produção, exposição ocupacional, exposição via produtos de consumo.
59.	2018	IVASK A, et al.	<i>Methodologies and approaches for the analysis of cell-nanoparticle interactions</i>	Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol	Fora de escopo - temática e especificidade. Revisão voltada métodos analíticos com potencial de analisar e quantificar interações célula-NP, principalmente relacionadas a NP de base metálica.
60.	2015	JAIN K, MEHRA NK, JAIN NK.	<i>Nanotechnology in Drug Delivery: Safety and Toxicity Issues</i>	Curr Pharm Des	Fora de escopo - temática abrangente sobre o potencial e perigos relacionados à nanotecnologia. Enfoque a sua aplicação biomédica, especialmente na área de nanomedicamentos (sistemas de entrega).
61.	2015	JELIAZKOVA N, et al.	<i>The eNanoMapper database for nanomaterial safety information</i>	Beilstein J Nanotechnol	Fora de escopo - finalidade. Abordagem voltada à funcionalidade da base de dados <i>eNanoMapper</i> exposta por meio da aplicação de API (interface de programação aplicada) e seu uso na visualização e modelagem.
62.	2010	KARLSSON HL.	<i>The comet assay in nanotoxicology research</i>	Anal Bioanal Chem	Fora de escopo - especificidade. Revisão de estudos relacionados ao uso do teste do cometa na pesquisa nanotoxicológica com enfoque em NP de base metálica e carbono.
63.	2016	KERMANIZADEH A., et al.	<i>A Multilaboratory Toxicological Assessment of a Panel of 10 Engineered Nanomaterials to Human Health--ENPRA Project--The Highlights, Limitations, and Current and Future Challenges</i>	J Toxicol Environ Health B Crit Rev	Fora de escopo. Traz os principais achados do projeto ENPRA, voltado ao desenvolvimento de estrutura de avaliação de risco quantitativa de 10 NMs no cenário ocupacional.
64.	2013	KETTIGER H, et al.	<i>Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism</i>	Int J Nanomedicine	Fora de escopo - especificidade e temática. Abordagem relacionada aos mecanismos de captura celular de NM.

65.	2013	KIM TANGUAY RL. KT,	<i>Integrating zebrafish toxicology and nanoscience for safer product development</i>	Green Chem	Fora de escopo - especificidade/temática. Abordagem direcionada à integração de <i>zebrafish</i> na avaliação nanotoxicológica
66.	2005	KIPEN LASKIN DL HM,	<i>Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology</i>	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	Fora de escopo - especificidade. Abordagem voltada à toxicidade pulmonar provocada por nanotubos de carbono de parede única.
67.	2018	KRUG HF, et al.	<i>The DaNa(2.0) Knowledge Base Nanomaterials-An Important Measure Accompanying Nanomaterials Development</i>	Nanomaterials (Basel)	Fora de escopo - artigo destinado à revisão das atividades do projeto DaNa2, enquanto coleção de informações relacionadas a aspectos de segurança, aplicação e propriedades de nanomateriais.
68.	2014	KRUG HF.	<i>Nanosafety research--are we on the right track?</i>	Angew Chem Int Ed Eng	Fora de escopo - enfoque às exposições pulmonar, gastrointestinal e dérmica e, apresentação comparativa de estudos por inalação e instilação quanto a sua significância na avaliação de exposição pulmonar.
69.	2017	LAUX P, et al.	<i>Biokinetics of Nanomaterials: the Role of Biopersistence</i>	NanoImpact	Fora de escopo - especificidade. Abordagem sobre biocinética e biopersistência pulmonar de NM (exposição ocupacional).
70.	2017	LUJAN H, SAYES CM.	<i>Cytotoxicological pathways induced after nanoparticle exposure: studies of oxidative stress at the 'nano-bio' interface</i>	Toxicol Res (Camb)	Fora de escopo - especificidade e temática. Enfoque na abordagem das vias de sinalização de citotoxicidade, a partir de perturbações proteicas e gênicas e o consequente desenvolvimento de vias de resultados adversos específicos.
71.	2015	LYNCH FEITSHANS I, KENDALL M. IL,	<i>'Bio-nano interactions: new tools, insights and impacts': summary of the Royal Society discussion meeting</i>	Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci	Fora de escopo - discussão ampla e difusa sobre o encontro da Royal Society.
72.	2009	M KELTY C.	<i>Beyond Implications and Applications: the Story of 'Safety by Design'</i>	Nanoethics	Fora de escopo - discussão genérica relacionada ao conceito de segurança e <i>safety by design</i> no contexto da nanotecnologia, com enfoque na toxicidade de <i>buckyballs</i> , partículas ultrafinas, fulereno, carbono.
73.	2012	MAHMOUDI M, et al.	<i>Cell "vision": complementary factor of protein corona in nanotoxicology</i>	Nanoscale	Fora de escopo - especificidade. Artigo dedicado a avaliar os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de SPIONS em várias linhagens celulares de diferentes origens para evidenciar as diferentes "visões celulares" manifestas à exposição desse NM.
74.	2010	MAIORANO G, et al.	<i>Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response</i>	ACS Nano	Fora de escopo - especificidade. Aborda a formação da proteína corona em NP de ouro recobertas em dois meios de cultura diferentes.
75.	2020	MALSCH I, et al.	<i>Embedding Ethical Impact Assessment in Nanosafety Decision Support</i>	Small	Fora de escopo - temática. Versa sobre pré-norma para o desenvolvimento de parte de um módulo de sistema de suporte à decisão para apoiar o trabalho de um novo Conselho de Governança de Risco para NM - por meio do esforço conjunto dos projetos Gov4nano, NANORIGO e RISKGONE H2020.
76.	2012	MARCHAN R.	<i>A special issue on nanotoxicology</i>	EXCLI J	Fora de escopo, lista alguns artigos relacionados ao campo de nanotoxicologia e sua aplicação a NM específicos.

77.	2015	MARCHESE ROBINSON RL, et al.	<i>An ISA-TAB-Nano based data collection framework to support data-driven modelling of nanotoxicology</i>	Beilstein J Nanotechnol	Fora de escopo - temática. Artigo dedicado à apresentação dos recursos de suporte à criação da base de dados ISA-TAB-Nano como ferramenta de suporte à análise e modelagem de dados nanotoxicológicos.
78.	2009	MARQUIS BJ, LOVE SA, BRAUN KL, HAYNES CL.	<i>Analytical methods to assess nanoparticle toxicity</i>	Analyst	Fora de escopo - especificidade. Abordagem direcionada aos métodos analíticos empregados na avaliação de propriedades físico-químicas e de toxicidade de NM.
79.	2016	MATYSIAK M, et al.	<i>Proteomic approach to nanotoxicity</i>	J Proteomics	Fora de escopo - finalidade. Revisão de literatura relacionada a estudos proteômicos envolvendo NM - com enfoque em NP específicas.
80.	2012	MAURER-JONES MA, HAYNES CL.	<i>Toward correlation in in vivo and in vitro nanotoxicology studies</i>	J Law Med Ethics	Fora de escopo - abordagem genérica, baseada em comparações restritas à análise de algumas NP, a partir de metodologias aleatórias e de resultados por vezes conflitantes, com baixa contribuição ao escopo do trabalho.
81.	2011	MAYNARD AD, WARHEIT DB, PHILBERT MA.	<i>The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond</i>	Toxicol Sci	Fora de escopo - abordagem reflexiva e bastante ampla sobre nanomateriais e nanotoxicologia - conteúdo pouco aplicável à finalidade do trabalho.
82.	2012	MAYNARD RL.	<i>Nano-technology and nanotoxicology</i>	Emerg Health Threats J	Fora de escopo - especificidade. versa sobre a toxicidade relacionada à exposição a NP liberadas como aerossóis ambientais.
83.	2017	MIRSHAFIEE V, et al.	<i>Facilitating Translational Nanomedicine via Predictive Safety Assessment</i>	Mol Ther	Fora de escopo - especificidade. Abordagem voltada a aplicações biomédica de algumas NP inorgânicas (Si-NPs, (Au-NPs) e Ag-NPs), SPIONs e QDs) - com enfoque superficial e pouco agregador sobre a avaliação de segurança preditiva.
84.	2018	MISSAOUI WN, ARNOLD RD, CUMMINGS BS.	<i>Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know</i>	Chem Biol Interact	Fora de escopo - abordagem geral voltada à aplicação da nanotecnologia a medicamentos (em termos de finalidade: terapêutica, diagnóstico e imagem; tipos e nanomateriais, vias de exposição).
85.	2016	MOAYYEDI S, MASHINCHIAN O, DINARVAND R.	<i>Osmolarity: A hidden factor in Nanotoxicology</i>	Daru	Fora de escopo - temática. Apresenta estimativa teórica para demonstrar a ausência de efeito significativo na osmolaridade do plasma causado por nanocarreadores no plasma.
86.	2011	MOGHIMI SM, HUNTER AC.	<i>Complement monitoring of nanomedicines and implants</i>	Adv Drug Deliv Rev	Fora de escopo - complemento de outra publicação. Abordagem limitada e genérica relacionada a materiais avançados e nanomateriais funcionais, biomateriais e sua interação com o sistema complemento.
87.	2020	MOGHIMI SM, SIMBERG D, ANCHORDOQUY TJ.	<i>Tuning the Engines of Nanomedicine</i>	Mol Ther	Fora de escopo - especificidade. Editorial voltado a nanomedicamentos e sua aplicação na pesquisa anticâncer.
88.	2019	MOGHIMI SM, ET AL.	<i>The Interplay Between Blood Proteins, Complement, and Macrophages on Nanomedicine Performance and Responses</i>	J Pharmacol Exp Ther	Fora de escopo - especificidade e temática. Abordagem voltada a engenharia de nanomedicamentos sob a perspectiva da ativação do sistema complemento mediada por nanopartículas administradas na corrente sanguínea.
89.	2018	MÜLHOPT S, et al.	<i>Characterization of Nanoparticle Batch-To-Batch Variability</i>	Nanomaterials (Basel)	Fora de escopo - especificidade. Aborda voltada à caracterização de lotes de NP específicas (SiO ₂ , TiO ₂ , CeO ₂ e ZnO) obtidos a partir de alguns processos de síntese - conforme parâmetros propostos por guia OCDE para avaliação a variabilidade entre lotes de um NM.

90.	2013	MUÑOZ B.	<i>Perspectives and approaches in nanotoxicology research</i>	Toxicol Methods	Mech	Fora de escopo - abordagem sob nanotoxicologia a luz de NP de prata, CNT.
91.	2017	NATH ROY D, GOSWAMI R, PAL A.	<i>Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology?</i>	Xenobiotica		Fora de escopo - especificidade. Abordagem baseada na revisão de estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> realizados com CNT, NP silicone, prata, dióxido de titânio, óxido de zinco, ouro, óxido de ferro, óxido de cobre para compreensão da resposta celular sob a perspectiva proteômica.
92.	2020	NELISSEN I, et al.	<i>Improving Quality in Nanoparticle-Induced Cytotoxicity Testing by a Tiered Inter-Laboratory Comparison Study</i>	Nanomaterials (Basel)		Fora de escopo - especificidade. Aborda a comparabilidade interlaboratórios para avaliação de citotoxicidade por meio do ensaio MTT de 2 NP bem caracterizadas (PS-COOH e PS-NH ₂).
93.	2014	NOGUEIRA DR, et al.	<i>Mechanisms Underlying Cytotoxicity Induced by Engineered Nanomaterials: A Review of In Vitro Studies</i>	Nanomaterials (Basel)		Fora de escopo - especificidade e temática. Abordagem direcionada aos mecanismos de citotoxicidade relacionados a ENM e testes relacionados.
94.	2011	NORPPA H, et al.	<i>Nano-specific genotoxic effects</i>	J Nanotechnol	Biomed	Fora de escopo - inespecificidade informacional (variabilidade entre os achados genotóxicos gerados por métodos <i>in vitro</i> e a incerta correlação com processo de carcinogenicidade).
95.	2014	NUÑEZ-ANITA RE, et al.	<i>Toxicology of antimicrobial nanoparticles for prosthetic devices</i>	Int J Nanomedicine		Fora de escopo - abordagem direcionada à aplicação de NP com propriedades antimicrobianas a próteses dentárias (dentaduras) - produto não enquadrado como dispositivo médico.
96.	2009	NYLAND JF, SILBERGELD EK.	<i>A nanobiological approach to nanotoxicology</i>	Hum Exp Toxicol		Fora de escopo - abordagem voltada à insuficiência dos métodos disponíveis para avaliação toxicológica e de risco de ENM, e a proposta de adoção da abordagem biológica de sistemas - direcionamento pouco aplicável ao escopo do trabalho.
97.	2005	OBERDÖRSTER G, OBERDÖRSTER E, OBERDÖRSTER J.	<i>Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles</i>	Environ Perspect	Health	Fora de escopo - especificidade. Abordagem voltada a NP aerotransportadas - com enfoque ocupacional (exposição por inalação) e ambiental.
98.	2010	OBERDÖRSTER G.	<i>Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology</i>	J Intern Med		Fora de escopo - especificidade. Abordagem direcionada à exposição por inalação.
99.	2012	OBERDÖRSTER G.	<i>Nanotoxicology: in vitro-in vivo dosimetry</i>	Environ Perspect	Health	Fora de escopo - abordagem voltada à exposição inalatória em contexto ocupacional.
100.	2016	OKSEL C, et al.	<i>Accurate and interpretable nanoSAR models from genetic programming-based decision tree construction approaches</i>	Nanotoxicology		Fora de escopo - versa sobre algoritmo promissor de programação genética baseado em árvore de decisão na identificação de relações entre descritores moleculares e efeitos biológicos de ENM a partir de estudos de casos.
101.	2015	PAL AK, et al.	<i>Implications of in vitro dosimetry on toxicological ranking of low aspect ratio engineered nanomaterials</i>	Nanotoxicology		Fora de escopo - especificidade e temática. Versa sobre metodologia de dosimetria <i>in vitro</i> para ENMs a base de carbono e ligas metálicas usando plataforma de dispersão-dosimetria padronizada para demonstração de sua generalização para ENM de baixa taxa de aspecto.
102.	2015	PAL AK, et al.	<i>Linking Exposures of Particles Released From Nano-Enabled</i>	Toxicol Sci		Fora de escopo - especificidade e temática. Versa sobre o desenvolvimento e validação de metodologia integrada padronizada para avaliação

			<i>Products to Toxicology: An Integrated Methodology for Particle Sampling, Extraction, Dispersion, and Dosing</i>			toxicológica de material particulado durante o ciclo de vida de produtos de base nanotecnológica - em cenário de exposição ocupacional (partículas liberadas de impressoras a laser) e ambiental (pela incineração ou termodecomposição de nanocompósito de CNT embebido em poliuretano).
103.	2020	PAPADIAMANTIS AG, et al.	<i>Metadata Stewardship in Nanosafety Research: Community-Driven Organisation of Metadata Schemas to Support FAIR Nanoscience Data</i>	Nanomaterials (Basel)		Fora de escopo - finalidade. Versa sobre práticas de gerenciamento de bons dados e diretrizes e boas práticas para organização na transferência de dados (metadados).
104.	2018	PARK MV, et al.	<i>Development of a systematic method to assess similarity between nanomaterials for human hazard evaluation purposes - lessons learnt</i>	Nanotoxicology		Fora de escopo - proposição de metodologia pragmática para quantificar similaridade entre material estudado e material relevante - desenvolvida para implementação da ferramenta GUIDEnano. Metodologia não validada para que possa ser considerada para fins regulatórios.
105.	2013	PELAZ B,	<i>Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions</i>	Small		Fora de escopo - especificidade. Aborda aspectos relacionados à nanobiointerface sob a ótica e NP inorgânicas.
106.	2015	POURGASHTASBI G.	<i>Nanotoxicology and challenges of translation</i>	Nanomedicine (Lond)		Fora de escopo - temática. Abordagem pouco relacionada ao objeto de interesse da dissertação, por seu enfoque nos desafios à translação e por conseguinte, conversão dos achados obtidos na fase pré-clínica para a clínica.
107.	2012	POURMAND ABDOLLAHI M.	<i>Current opinion on nanotoxicology</i>	Daru		Fora de escopo - abordagem dispersa e reflexiva sobre o tema, pouco aplicável ao propósito da dissertação.
108.	2011	PUMERA M.	<i>Nanotoxicology: the molecular science point of view</i>	Chem Asian J		Fora de escopo - especificidade. Abordagem baseada em exemplificação de mecanismos toxicológicos deflagrados por NP metálicas e CNT, bem como na avaliação de nanotoxicidade desses NM, além de fulerenos e grafeno.
109.	2018	PUZYN T, et al.	<i>Perspectives from the NanoSafety Modelling Cluster on the validation criteria for (Q)SAR models used in nanotechnology</i>	Food Chem Toxicol		Fora de escopo - temática. Abordagem minuciosa sobre modelo QSAR e sua aplicabilidade à predição de perigos/respostas biológicas relacionados a NM a partir dos princípios para validação estabelecidos pela OCDE - não sendo, portanto, aplicável ao escopo do trabalho.
110.	2018	QIU TA , CLEMENT PL , HAYNES CL .	<i>Linking nanomaterial properties to biological outcomes: analytical chemistry challenges in nanotoxicology for the next decade</i>	Chem Commun (Camb)		Fora de escopo - temática/especificidade. Abordagem voltada às perspectivas elaboradas por químicos, sobre os desafios analíticos relacionados à nanotoxicologia, esperados para a próxima década.
111.	2016	RASMUSSEN K, et al.	<i>Review of achievements of the OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials' Testing and Assessment Programme. From exploratory testing to test guidelines</i>	Regul Pharmacol	Toxicol	Fora de escopo - versa sobre o progresso do Grupo de trabalho WPMN no programa de Avaliação e Teste de ENMs a partir das diretrizes OCDE e análise de sua aplicabilidade ao cenário de NMs.
112.	2019	RASMUSSEN K, et al.	<i>Developing OECD test guidelines for regulatory testing of nanomaterials to ensure mutual acceptance of test data</i>	Regul Pharmacol	Toxicol	Fora de escopo - versa sobre o papel do Grupo de trabalho WPMN no processo de adequação de diretrizes OCDE a nanomateriais, e proposição de novos métodos direcionados a NM.

113.	2017	REIMHULT E.	<i>Nanoparticle Risks and Identification in a World Where Small Things Do Not Survive</i>	Nanoethics	Fora de escopo - nota de discussão de cunho reflexivo relacionado a diversos tópicos.
114.	2019	REZAEI R, et al.	<i>The Role of Nanomaterials in the Treatment of Diseases and Their Effects on the Immune System</i>	Open Access Maced J Med Sci	Fora de escopo – temática. Abordagem terapêutica voltada ao uso de NM no tratamento de doenças autoimunes, vacinas, quimioterapias, terapias antitumorais.
115.	2020	ROMEIO D, et al.	<i>An integrated pathway based on in vitro data for the human hazard assessment of nanomaterials</i>	Environ Int	Fora de escopo - temática. Apresenta uma proposta de estimativa de NOAEL, LOAEL, EC50 ou ED50 a partir dos dados <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> disponíveis para uso na avaliação de risco e avaliação de ciclo de vida.
116.	2012	SANTAMARIA A.	<i>Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology</i>	Methods Mol Biol	Fora de escopo – temática. Abordagem predominantemente histórica, pouco relacionada ao escopo do trabalho.
117.	2012	SCHNACKENBERG LK, SUN J, BEGER RD.	<i>Metabolomics techniques in nanotoxicology studies</i>	Methods Mol Biol	Fora de escopo - especificidade. Abordagem voltada a dois métodos analíticos aplicados à análise metabolômica: NMR e LC/ MS para estudo do potencial toxicológico de NP.
118.	2005	SEATON A, DONALDSON K.	<i>Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small</i>	Lancet	Fora de escopo - temática e especificidade. Abordagem voltada a perigos de exposição a alguns NM por inalação (CNT), incluindo-se a exposição ambiental (poluição ambiental).
119.	2010	SEATON A, TRAN L, AITKEN R, DONALDSON K.	<i>Nanoparticles, human health hazard and regulation</i>	J R Soc Interface	Fora de escopo - temática. Abordagem voltada predominantemente à exposição ambiental e ocupacional de NM.
120.	2018	SELVARAJ C, et al.	<i>Molecular dynamics simulations and applications in computational toxicology and nanotoxicology</i>	Food Chem Toxicol	Fora de escopo - temática e finalidade. Apresentação de protocolo para corrida de simulações de dinâmica molecular, ferramentas populares e aplicações dessas simulações em toxicologia computacional e nanotoxicologia.
121.	2004	SERVICE RF.	<i>Nanotoxicology. Nanotechnology grows up</i>	Science	Fora de escopo - temática. Abordagem sobre os aspectos sociais e interesses econômicos relacionados à nanotecnologia nos âmbitos acadêmico e comercial, bem como sobre preocupações de ordem sanitária (NM baseados em carbono) e ambiental em torno dessa nova tecnologia, o que inspira cautela quanto a sua utilização.
122.	2016	SHATKIN JA, et al.	<i>Advancing Risk Analysis for Nanoscale Materials: Report from an International Workshop on the Role of Alternative Testing Strategies for Advancement</i>	Risk Anal	Fora de escopo - finalidade. Reporte das discussões realizadas por <i>experts</i> no âmbito do workshop <i>SRA Nano Risk II</i> sobre o desenvolvimento e implementação de estratégias de teste alternativas para categorização de riscos de NM. Abordagem ampla e de aplicabilidade limitada ao escopo do trabalho.
123.	2015	SHIN SW, SONG IH, UM SH.	<i>Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity</i>	Nanomaterials (Basel	Fora de escopo – abordagem baseada em manifestações/comportamentos de NM específicos, restringindo-se a concepções gerais.
124.	2020	SHINDE RB, et al.	<i>State-of-Art Bio-Assay Systems and Electrochemical Approaches for Nanotoxicity Assessment</i>	Front Bioeng Biotechnol	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada a métodos analíticos eletroquímicos e seu potencial para aplicação em estudos de nanotoxicológicos ou como ferramentas analíticas alternativas a métodos tradicionais.
125.	2011	SILBERGELD EK,	<i>t⁴ workshop report. Nanotoxicology: "the end of the beginning" - signs on</i>	ALTEX	Fora de escopo - abordagem direcionada à possibilidade de uso de modelos alternativos completos para triagem de NM - como <i>zebrafish</i> e <i>C.elegans</i> ,

			<i>the roadmap to a strategy for assuring the safe application and use of nanomaterials</i>		sendo apresentado duas abordagens experimentais vislumbradas para testagem num cenário de análise de nanomedicamento.
126.	2020	SINGH AV, et al.	<i>Artificial Intelligence and Machine Learning in Computational Nanotoxicology: Unlocking and Empowering Nanomedicine</i>	Adv Healthc Mater	Fora de escopo - especificidade. Abordagem baseada na análise de NP específicas, apresentação de modelos de citotoxicidade baseados em Nano-QSAR e modelo dosimétrico para nanotoxicologia inalatória - a partir de descritores químicos/moleculares específicos
127.	2009	SINGH N.	<i>Conference scene - nanotoxicology: health and environmental impacts</i>	Nanomedicine (Lond)	Fora de escopo - abordagem direcionada a temáticas diversas, muitas das quais baseadas em dados provenientes de NP específicas.
128.	2007	SOLOVIEV M.	<i>Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles</i>	J Nanobiotechnology	Fora de escopo - temática. Abordagem geral acerca da nanobiotecnologia a partir da exemplificação de nanopartículas feitas de biopolímeros e de algumas aplicações.
129.	2014	STONE V, et al.	<i>ITS-NANO--prioritising nanosafety research to develop a stakeholder driven intelligent testing strategy</i>	Part Fibre Toxicol	Fora de escopo - temática. Aborda programa de priorização de pesquisa em curto, médio e longo prazo no âmbito do ITS-NANO (estratégia de teste inteligente).
130.	2014	TANGUAY RL.	<i>Challenges and Advances in Nanotoxicology</i>	Nanomaterials (Basel)	Fora de escopo - abordagem sobre o impacto negativo de ENM aos sistemas biológicos a nível humano e ambiental a partir de exemplos específicos em termos de NP, sistemas e desfechos.
131.	2016	TANTRA R, et al.	<i>Suitability of analytical methods to measure solubility for the purpose of nanoregulation</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - especificidade/temática. Abordagem direcionada à análise de solubilidade - considerando requisitos analíticos, bem como técnicas e métodos analíticos empregados, e tomando como base a regulação de cosméticos.
132.	2015	TRALAU T, et al.	<i>Regulatory toxicology in the twenty-first century: challenges, perspectives and possible solutions</i>	Arch Toxicol	Fora de escopo - temática. Abordagem inespecífica, não voltada a regulação, além de direcionada a produtos diversos não relacionados à temática objeto de interesse (biocidas, metabolitos e resíduos em alimentos e rações, lençóis subterrâneos, segurança dos alimentos, contaminantes, produtos para consumo, cosméticos e brinquedos).
133.	2019	UTEMBE W.	<i>Chirality, a neglected physico-chemical property of nanomaterials? A mini-review on the occurrence and importance of chirality on their toxicity</i>	Toxicol Lett	Fora de escopo- especificidade. Abordagem direcionada à análise da quiralidade como propriedade físico-química negligenciada, presente também em NM, com base em informações relacionadas a NP específicas.
134.	2015	VALSAMI-JONES E, LYNCH I.	<i>NANOSAFETY. How safe are nanomaterials?</i>	Science	Fora de escopo - abordagem diversa sobre nanosseguurança, com destaque a achados ambientais.
135.	2017	VISWANATH B, KIM S.	<i>Influence of Nanotoxicity on Human Health and Environment: The Alternative Strategies</i>	Rev Environ Contam Toxicol	Fora de escopo - abordagem geral e dispersa, voltada aos efeitos e toxicidade de algumas categorias de nanopartículas no contexto da saúde humana; considerações relacionadas à ecotoxicidade no ar, água e solo; bem como a nanociência verde, e desafios da nanotecnologia verde.
136.	2016	WANG L, CHEN C.	<i>Pathophysiologic mechanisms of biomedical nanomaterials</i>	Toxicol Pharmacol	Fora de escopo - especificidade. Abordagem pormenorizada de mecanismos fisiológicos/de sinalização envolvidos na interação nanobiológica de NM inorgânicos.

137.	2020	WANG X, CUI X, ZHAO Y, CHEN C.	<i>Nano-bio interactions: the implication of size-dependent biological effects of nanomaterials</i>	Sci China Life Sci	Fora de escopo- especificidade. Aborda as nanobiointerações sob o viés de tamanho, a partir de achados relacionados a NP específicas, destacando os principais órgãos afetados, além de também realizar considerações sobre a permeabilidade e retenção facilitadas pelo tamanho do NM e sua aplicação no tratamento de tumores-alvo.
138.	2016	WANG Y, et al.	<i>Techniques for Investigating Molecular Toxicology of Nanomaterials</i>	J Biomed Nanotechnol	Fora de escopo - temática. Abordagem relacionada a técnicas de toxicologia molecular aplicáveis à nanotecnologia (agrupadas em 6 categorias - a partir de dados relacionados à avaliações de NP específicas, sob uma perspectiva descritiva, pouco aplicável ao escopo do trabalho.
139.	2018	WARHEIT DB.	<i>Hazard and risk assessment strategies for nanoparticle exposures: how far have we come in the past 10 years?</i>	F1000Res	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada aos principais projetos europeus no campo de avaliação de risco e considerações relacionadas a riscos advindos da exposição ocupacional a NM, à avaliação do potencial fibrogênico pulmonar de NM aerolizados e outras abordagens <i>in vitro</i> relacionadas à exposição pulmonar.
140.	2010	WARHEIT DB.	<i>Debunking some misconceptions about nanotoxicology</i>	Nano Lett	Fora de escopo – especificidade. Abordagem a partir da análise de NP de TiO ₂ , voltada à toxicidade pulmonar.
141.	2011	WEISS C, DIABATÉ S.	<i>A special issue on nanotoxicology</i>	Arch Toxicol	Fora de escopo - abordagem dispersa sobre nanotoxicologia, de pouca utilidade ao escopo do trabalho.
142.	2020	WINKLER DA.	<i>Role of Artificial Intelligence and Machine Learning in Nanosafety</i>	Small	Fora de escopo – temática. Abordagem generalista sobre <i>machine learning</i> e sua aplicabilidade ao desenvolvimento de NM mais seguros.
143.	2020	WU YH,	<i>The Recent Progress in Nanotoxicology and Nanosafety from the Point of View of Both Toxicology and Ecotoxicology</i>	Int J Mol Sci	Fora de escopo - especificidade. Abordagem baseada em achados relacionados aos efeitos/impactos das NP metálicas e óxido-metálicas no corpo e meio ambiente.
144.	2009	XIA T, LI N, NEL AE.	<i>Potential health impact of nanoparticles</i>	Annu Rev Public Health	Fora de escopo - especificidade. Abordagem direcionada a avaliação comparativa entre os efeitos adversos causados por NP e fibras, e aqueles provocados por partículas ultrafinas, com enfoque à toxicidade pulmonar.
145.	2016	ZANGANEH S,	<i>Protein corona: Opportunities and challenges</i>	Int J Biochem Cell Biol	Fora de escopo - especificidade. Abordagem direcionada a aplicações relacionadas à proteína corona no âmbito da nanomedicina, especialmente, no âmbito de nanomedicamentos.
146.	2014	ZHANG M,	<i>Toxicological properties of nanomaterials</i>	J Nanosci Nanotechnol	Fora de escopo - abordagem relacionada ao avanço dos estudos nanotoxicológicos, com enfoque na experiência do laboratório dos autores, voltado à avaliação de exposição pulmonar.
147.	2013	ZHU M, et al.	<i>Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate</i>	Acc Chem Res	Fora de escopo - especificidade. Abordagem baseada em achados relacionados a algumas propriedades físico-químicas de NM específicos.
148.	2020	ZHU S, et al.	<i>15 Years of Small: Research Trends in Nanosafety</i>	Small	Fora de escopo - análise bibliométrica das publicações relacionadas à nanosseguurança na revista Small desde 2005, e suas tendências em termos de países, instituições mais relevantes e produtivas nesse campo.
149.	2021	AHMAD F., ABUBSHAIT S.A., ABUBSHAIT H.A.	<i>Untargeted metabolomics for Achilles heel of engineered nanomaterials' risk assessment</i>	Chemosphere	Fora de escopo - temática. Proposição de metodologia <i>omics</i> (<i>untargeted metabolomics</i>) como procedimento de rotina para avaliação de risco/perigo para produtos nanotecnológicos futuros.

150.	2017	COLLINS A.R., et al.	<i>High throughput toxicity screening and intracellular detection of nanomaterials</i>	Wiley Interdiscip Ver Nanomed Nanobiotechnol.	Fora de escopo - temática. Apresentação e discussão de metodologias diversas aplicadas a avaliação de toxicidade de NM a partir de diferentes princípios - com ênfase nas adaptações de alto rendimento.
151.	2013	DONALDSON K., POLAND C.A.	<i>Nanotoxicity: Challenging the myth of nano-specific toxicity</i>	Curr Opin Biotechnol.	Fora de escopo - abordagem baseada em informações relacionadas a categorias de NM específicos, de aplicabilidade limitada ao escopo generalista da dissertação.
152.	2012	ELSAESSER A., HOWARD C.V.	<i>Toxicology of nanoparticles</i>	Adv Drug Deliv Rev	Fora de escopo - abordagem voltada a diferentes mecanismos de toxicidade a nível celular, vias de exposição,
153.	2012	GAJEWICZ A., et al.	<i>Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches</i>	Adv Drug Deliv Rev	Fora de escopo - Abordagem voltada a NM específicos - a base de carbono e metal/óxidos metálicos, com predomínio do primeiro em relação ao disposto sobre o uso de modelos computacionais na avaliação de risco.
154.	2018	GEHR P.	<i>Interaction of nanoparticles with biological systems</i>	Colloids Surf. B	Fora de escopo - abordagem genérica sobre alguns mecanismos de interação celular e vias de exposição.
155.	2017	GERLOFF K., et al.	<i>The Adverse Outcome Pathway approach in nanotoxicology</i>	Comput. Toxicol	Fora de escopo - especificidade. Abordagem AOP baseada em caso de hepatotoxicidade induzida por oxido metálico.
156.	2018	GKIKI D.A., et al.	<i>Balancing nanotoxicity and returns in health applications: The Prisoner's Dilemma</i>	Toxicology	Fora de escopo - temática. Abordagem voltada a alguns materiais estudados quanto a sua atividade anticâncer e mecanismos relacionados.
157.	2008	GONZALEZ L., LISON D., KIRSCH- VOLDERS M.	<i>Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - especificidade/temática. Abordagem baseada em efeitos genotóxicos deflagrados por uma série de NM, tendo a avaliação relacionada aos tipos de estudo sido construída a partir de busca a literatura - invariavelmente relacionada à avaliação de NM específicos, expostos a diferentes vias e tipos celulares/espécies - o que inviabiliza generalizações.
158.	2020	HALAPPANAVAR S., et al.	<i>A methodology for developing key events to advance nanomaterial-relevant adverse outcome pathways to inform risk assessment</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - temática/especificidade. Abordagem relacionada à aplicação de AOP na avaliação de risco à saúde ambiental e ocupacional, a partir de dados obtidos em busca à literatura de um conjunto de 7 NM (<i>silver, Cerium Oxide, Copper Oxide, Multi-walled Carbon Nanotubes, Single-walled Carbon Nanotubes, Titanium Dioxide, Zinc Oxide</i>) - a partir dos quais 2 estudos de caso foram propostos.
159.	2018	HALAPPANAVAR S., et al.	<i>Promise and peril in nanomedicine: the challenges and needs for integrated systems biology approaches to define health risk</i>	Wiley Interdiscip Ver Nanomed Nanobiotechnol	Fora de escopo - temática. Abordagem voltada a nanomedicamentos.
160.	2007	HANSEN S.F., et al.	<i>Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo – temático. Avaliação da funcionalidade de modelo de estrutura de categorização a partir de NP ilustrativas para identificação de perigos relacionados a determinadas características.
161.	2011	HARTUNG T., SABBIONI E.	<i>Alternative in vitro assays in nanomaterial toxicology</i>	Wiley Interdiscip Ver Nanomed Nanobiotechnol	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada a métodos alternativos aplicáveis a substâncias químicas, sendo parte deles passíveis de aplicação a NM enquanto matérias-primas, mas não enquanto parte de produto acabado, como é o enfoque da dissertação

162.	2019	LAMON L.,	<i>Physiologically based mathematical models of nanomaterials for regulatory toxicology: A review</i>	Comput. Toxicol.	Fora de escopo – especificidade. Modelos de dosimetria aplicáveis ao trato respiratório, tendo a análise sobre os modelos toxicocinético e toxicodinâmico fisiologicamente baseados sido realizada a partir de literatura diversa (baseada em diferentes modelos), que pouco contribuiu para uma visão geral sobre esse tipo de estratégia alternativa.
163.	2017	LANDSIEDEL R.,	<i>Safety assessment of nanomaterials using an advanced decision-making framework, the DF4nanoGrouping</i>	J Nanopart Res.	Fora de escopo - especificidade. Aborda a avaliação de risco relacionada à exposição por inalação a partir de estudos de caso realizados com NM carbonáceos, metais óxidos, sulfato metálicos, de sílica amorfa, pigmentos orgânicos, poeira de quartzo – sob a perspectiva da estrutura de tomada de decisão DF4nanoGrouping.
164.	2014	LÓPEZ-ALONSO C., GARCÍA-CAMBERO J.P.	<i>Informatic resources useful for the development of biomedical applications of nanomaterials and their toxicological evaluation.</i>	Rev. Toxicol.	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada à apresentação de plataformas, bases de dados e recursos disponíveis na web para familiarização, estudo e pesquisa na área de nanotecnologia.
165.	2015	MADL A.K., et al.	<i>Toxicology of wear particles of cobalt-chromium alloy metal-on-metal hip implants Part II: Importance of physicochemical properties and dose in animal and in vitro studies as a basis for risk assessment</i>	Nanomedicine	Fora de escopo - haja vista as deficiências apontadas nos estudos até então conduzidos, quanto às variações observadas nas NP utilizadas em estudos <i>in vitro</i> ou produzidas por estudos em simulador, e suas diferenças em relação às NP geradas em pacientes implantados com próteses de quadril metal-metal - o que associado à limitada caracterização físico-química (por vezes centrada apenas na composição), condições de exposição e dose administradas (nem sempre realistas) - inviabilizam o entendimento das interações biológicas e suas repercussões adversas observadas, bem como sua extrapolação ao cenário fisiológico real – pouco contribuindo para o propósito da dissertação em tela.
166.	2011	MARQUIS B.J., et al.	<i>The bench scientist's perspective on the unique considerations in nanoparticle regulation</i>	J. Nanoparticle Res.	Fora de escopo - especificidade. Abordagem voltada ao exercício de se pensar os possíveis requisitos regulatórios aplicáveis à análise pré-clínica de uma NP de sílica mesoporosa multifuncional (carregada com Doxorubicina) sob a perspectiva regulatória de um produto combinado passível de regularização pela FDA.
167.	2007	OBERDÖRSTER G., STONE V., DONALDSON	<i>Toxicology of nanoparticles: A historical perspective</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo – temática. Abordagem histórica da nanotoxicologia, em paralelo com as partículas ultrafinas, com enfoque em exposição inalatória/ocupacional de NP específicas, como aquelas baseadas em carbono. Além de abordar aspectos relacionados à ecotoxicologia.
168	2012	OESCH F., Landsiedel R.	<i>Genotoxicity investigations on nanomaterials</i>	Arch Toxicol.	Fora de escopo – abordagem baseada na apresentação de resultados positivos e negativos de testes de genotoxicidade identificados na literatura até 2008, comparações estabelecidas a partir do tamanho da partícula, do teste utilizado, substância investigada.
169.	2016	PARK H.-G., Yeo M.-K.	<i>Nanomaterial regulatory policy for human health and environment</i>	Mol. Cell. Toxicol.	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada à regulação insuficiente de produtos de consumo que contêm nanomateriais na Coreia do Sul, e uma visão geral desse processo ao redor do globo, inclusive no que tange a organizações relacionadas à normatização.

170.	2018	PARK M.V.D.Z., et al.	<i>Development of a systematic method to assess similarity between nanomaterials for human hazard evaluation purposes—lessons learnt</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - temática. Abordagem direcionada à apresentação de uma metodologia de avaliação de similaridade baseada no projeto GuideNano - restrito a exposição pelas vias inalatória, oral e dérmica.
171.	2019	PAWAR G., et al.	<i>In silico toxicology data resources to support read-across and (Q)SAR</i>	Front Pharmacol.	Fora de escopo – temática. Revisão abrangente destinada à identificação de diversas bases de dados contendo informações toxicológicas dedicadas a temáticas diversas, dentre as quais nanotoxicológicas - avaliadas sob diferentes perspectivas: acessibilidade, interoperabilidade, relevância dos desfechos, usabilidade, natureza da informação...Listadas e consolidadas 900 bases de dados, das quais 22 relacionavam-se a nanotoxicologia.
172.	2019	PEREIRA A.C., et al.	<i>The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach</i>	Environ Pollut	Fora de escopo – especificidade/temática. Revisão dedicada à avaliação da literatura existente sobre efeitos teratogênicos e embriotoxicidade de NM em <i>zebrafish</i> , principalmente, voltados ao contexto ecotoxicológico de NM inorgânicos, com especial destaque para alguns deles (SiO ₂ , ZnO, TiO ₂ , Au, CuO, QDs), mas também orgânicos como CNT, fulerenos, quitosana.
173.	2019	REZAEI G., et al.	<i>Protein corona variation in nanoparticles revisited: A dynamic grouping strategy</i>	Colloids. Surf. B	Fora de escopo - temática. Apresenta um modelo de investigação relacionado à proteína corona, baseado em estratégia de agrupamento a partir do conceito RADAR (baseado em fatores chave relacionados a nanobiointerface), com vistas ao desenvolvimento de NP mais seguras, eficientes e customizáveis pelo direcionamento de estudos de refinamento.
174.	2019	RIEDIKER M., et al.	<i>Particle toxicology and health - Where are we?</i>	Part Fibre Toxicol.	Fora de escopo – especificidade/temática. Abordagem voltada à toxicidade pulmonar de partículas e fibras resultantes à exposição ambiental e ocupacional, principalmente, bem como suas repercussões sistêmicas.
175.	2019	RIM K.-T.	<i>In vitro Models for Chemical Toxicity: Review of their Applications and Prospects</i>	Toxicol. Environ. Health Sci.	Fora de escopo – temática. Abordagem direcionada à avaliação de toxicidade pulmonar de substâncias químicas e partículas transportadas pelo ar para determinação de sua absorção.
176.	2018	RYCROFT T., et al.	<i>Nanotoxicology and nanomedicine: making development decisions in an evolving governance environment</i>	J. Nanoparticle Res	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada aos desenvolvedores de NM voltados à nanomedicina, a partir do uso de ferramentas de tomada de decisão multicritério.
177.	2010	SOM C., et al.	<i>The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts</i>	Toxicology	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada à avaliação do ciclo de vida de nanoproductos, sob uma perspectiva de desenvolvimento, com enfoque nos impactos à saúde ambiental e seus efeitos sobre a sustentabilidade ambiental - aspecto não contemplado na dissertação.
178.	2007	UNFRIED K., A., et al.	<i>Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms</i>	Nanotoxicology	Fora de escopo - temática. Proposição de protocolo de pesquisa integrada para identificar respostas celulares a NP em complementação às estratégias de triagem toxicológica a partir de uma abordagem baseada em mecanismo.
179.	2015	WOLFRAM J., et al.	<i>Safety of nanoparticles in medicine</i>	Curr Drug Targets	Fora de escopo – temática. Abordagem voltada a nanomedicamentos.
180.	2014	ZORODDU M.A. et al.	<i>Toxicity of nanoparticles</i>	Curr Med Chem.	Fora de escopo - temática/especificidade. Abordagem voltada predominantemente à exposição inalatória de NP engenheiradas diversas, em meio ocupacional e ambiental, tendo as vias dérmica e gastrointestinal sido brevemente abordada a partir de resultados apresentados por estudos de NP específicas.

9.3 APÊNDICE C – SUMÁRIO DOS ARTIGOS SELECIONADOS

14.	2020	CAI, X. et al	Revisão	<i>Molecular Mechanisms, Characterization Methods, and Utilities of Nanoparticle Biotransformation in Nanosafety Assessments.</i>	Small	11.459	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
15.	2015	BURELLO, E.; WORTH, A.	Carta ao Editor	<i>A rule for designing safer nanomaterials: Do not interfere with the cellular redox equilibrium.</i>	Nanotoxicology	4.925	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
16.	2015	COHEN, J. M.; DELOID, G. M.; DEMOKRITOU, P.	Revisão	<i>A critical review of in vitro dosimetry for engineered nanomaterials.</i>	Nanomedicine	4.727	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
17.	2015	DOCTER, D. et al	Revisão	<i>No king without a crown--impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine.</i>	Nanomedicine	4.727	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
18.	2015	DUSINSKA, M. et al.	Revisão	<i>Towards an alternative testing strategy for nanomaterials used in nanomedicine: lessons from NanoTEST.</i>	Nanotoxicology	4.925	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
19	2015	FADEEL, B. et al.		<i>Keeping it real: the importance of material characterization in nanotoxicology.</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications	2.985	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
20.	2017	FOREST, V.; POURCHEZ, J.	Revisão	<i>Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona.</i>	Materials Science and Engineering C	5.88	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
21.	2020	JIA, J. et al.	Editorial	<i>Nano-Bio Interactions: Ecotoxicology and Cytotoxicity of Nanomaterials.</i>	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	4.21	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
22.	2012	JOHNSTON, H. et al.	Revisão	<i>Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications.</i>	Journal of Controlled Release	7.366	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
23.	2020	OVAIS, M. et al.	Revisão	<i>Recent advances in the analysis of nanoparticle-protein coronas.</i>	Nanomedicine	4.300	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
24.	2017	LIU, Y., WORKALEMAHU, B., JIANG, X.	Revisão	<i>The Effects of Physicochemical Properties of Nanomaterials on Their Cellular Uptake In Vitro and In Vivo.</i>	Small	11.459	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e
25.	2017	NEAGU, M. et al	Revisão	<i>Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology.</i>	Archives of Toxicology	4.21	Caracterização Química, Proteína e Nanobiointeração	Físico-Corona e

26.	2017	SHANNAHAN, J.	Revisão	<i>The biocorona: A challenge for the biomedical application of nanoparticles.</i>	Nanotechnology Reviews	7.35	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
27.	2010	RIVERA, G. et al	Perspectiva	<i>Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: The present and the future.</i>	ACS Nano	15.881	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
28.	2019	SINGH, A. et al.	Revisão	<i>Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design.</i>	Toxicology Mechanisms and Methods	2.295	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
29.	2015	WESTMEIER, D.; STAUBER, R. H.; DOCTER, D.	Revisão	<i>The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM).</i>	Toxicology and Applied Pharmacology	4.219	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
30.	2014	WOLFRAM, J. et al.	Revisão	<i>The nano-plasma interface: Implications of the protein corona Joy.</i>	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	3.997	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
31.	2020	XIARCHOS, I. et al.	Revisão	<i>Nanocharacterization, Materials Modeling, and Research Integrity as Enablers of Sound Risk Assessment: Designing Responsible Nanotechnology.</i>	Small	11.459	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
32.	2009	DHAWAN, A.; SHARMA, V.; PARMAR D.	Revisão	<i>Nanomaterials: A challenge for toxicologists.</i>	Nanotoxicology	4.925	Caracterização Físico-Química, Proteína Corona e Nanobiointeração
33.	2017	BORASCHI, D.; CASTELLANO, L.R.C.; P.	Editorial	<i>Interaction of Nanomaterials with the immune System: role in Nanosafety and Nanomedicine.</i>	Frontiers in immunology	6.429	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
34.	2020	BORASCHI, D. ET AL.	Revisão	<i>Addressing Nanomaterial Immunofafety by Evaluating Innate Immunity across Living Species.</i>	Small	11.459	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
35.	2018	ALSALEH, N. B.; BROWN, J. M.	Opinion	<i>Immune responses to engineered nanomaterials: Current understanding and challenges.</i>	Current Opinion in Toxicology	0.877	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
36.	2020	ALSALEH, N. B.; BROWN, J. M.	Revisão	<i>Engineered Nanomaterials and Type I Allergic Hypersensitivity Reactions.</i>	Frontiers in immunology	6.429	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
37.	2020	CHEN, C.; LEONG, D.T.; LYNCH, I.	Editorial	<i>Rethinking Nanosafety: Harnessing Progress and Driving Innovation.</i>	Small	11.459	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
38.	2020	CHEN, C.; LEONG, D.T.; LYNCH, I	Editorial	<i>Rethinking Nanosafety Part II: Leveraging Progress to Pioneer New Approaches and Solutions.</i>	Small	11.459	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
39.	2010	DONNER, M. et al.	Editorial	<i>Genotoxicity of engineered nanomaterials.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica

40.	2010	DONALDSON, K.; POLAND, C.A.; SCHINS, R.P.F.	Revisão	<i>Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
41.	2017	CATALÁN, J.; NORPPA, H.	Opinião	<i>Safety Aspects of Bio-based Nanomaterials.</i>	Bioengineering	2.240	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
42.	2009	DOAK, S. et al.	Relato	<i>Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology.</i>	Mutagenesis	3.379	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
43.	2017	CATALÁN, J.; STOCKMANN- JUVALA, H.; NORPPA, H.		<i>A theoretical approach for a weighted assessment of the mutagenic potential of nanomaterials.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
44.	2020	CRONIN, J. G.; et al.	Perspectiva	<i>Nanomaterials and innate immunity: A perspective of the current status in nanosafety.</i>	Chemical Research in Toxicology	3.184	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
45.	2017	DUSINSKA, M. et al.	Revisão	<i>Immunotoxicity, Genotoxicity and Epigenetic Toxicity of Nanomaterials: New strategies for toxicity testing?</i>	Food and Chemical Toxicity	4.679	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
46.	2012	DOAK, S. H. PFUHLER, S.	Prefácio	<i>Nanotoxicology. Preface.</i>	Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis	2.506	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
47.	2010	GREIM, H. & NORPPA, H.	Conclusões	<i>Genotoxicity testing of nanomaterials – Conclusions.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
48.	2015	FARRERA, C. & FADEEL, B.	Revisão	<i>It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system.</i>	European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	4.604	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
49.	2017	HIGASHISAKA, K. et al	Revisão	<i>Nano-safety research: Examining the associations among the biological effects of nanoparticles and their physicochemical properties and kinetics.</i>	Biological and Pharmaceutical Bulletin	1.863	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
50.	2020	HIMLY, M. et al.	Revisão	<i>When Would Immunologists Consider a Nanomaterial to be Safe? Recommendations for Planning Studies on Nanosafety.</i>	Small	11.459	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
51.	2017	HU, X. et al	Revisão	<i>Strategies and knowledge gaps for improving nanomaterial biocompatibility.</i>	Environment International	7.577	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
52.	2016	LI, Y. & BORASCHI, D.	Revisão	<i>Endotoxin contamination: a key element in the interpretation of nanosafety studies.</i>	Nanomedicine	4.3	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
53.	2017	LI, Y.; FUJITA, M.; BORASCHI, D.	Perspectiva	<i>Endotoxin Contamination in Nanomaterials leads to misinterpretation of Immunosafety Results.</i>	Frontiers in Immunology	6.429	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
54.	2014	KARLSSON, H. et al.	Revisão	<i>Can the Comet Assay be Used Reliably to Detect Nanoparticle-Induced Genotoxicity?</i>	Environmental and Molecular Mutagenesis	3.131	Avaliação e Testes de Segurança Biológica

55.	2014	MAGDOLENOVA, Z., et al.	Revisão	<i>Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
56.	2012	GREISH, K.; THIAGARAJAN, G.; GHANDEHARI, H.	Revisão	<i>In vivo methods of nanotoxicology (Chapter 17).</i>	Methods in Molecular Biology (Book series)	1.17 (impact score)	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
57.	2018	SAIFI, M. A.; KHAN, W.; GODUGU, C.	Revisão	<i>Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles.</i>	Pharmaceutical Nanotechnology	2.69	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
58.	2010	SHVEDOVA, A. et al	Revisão	<i>Close encounters of the small kind: Adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems.</i>	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	11.250	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
59.	2009	STONE, V.; JOHNSTON, H.; SCHINS, R.P.F.	Revisão	<i>Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological Considerations.</i>	Critical Reviews in Toxicology	5.313	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
60.	2018	WU, T.; TANG, M.	Revisão	<i>Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs.</i>	Journal of Applied Toxicology	2.997	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
61.	2009	JONES, C. F.; GRAINGER, D.W	Revisão	<i>In vitro assessment of nanomaterial toxicity.</i>	Advanced Drug Delivery Reviews	13.300	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
62.	2012	LANDSIEDEL, R. et al.	Revisão	<i>Toxico-/biokinetics of nanomaterials.</i>	Arch Toxicol	5.059	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
63.	2017	HJORTH, R.; VAN HOVE, L.; WICKSON, F.	Revisão	<i>What can nanosafety learn from drug development? The feasibility of "safety by design".</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
64.	2020	ZIELÍNSKA, B. et al.	Revisão	<i>Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-by-Design and Testing at a Glance.</i>	International Journal of Environmental Research and Public Health	3.390	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
65.	2013	LOURO, H.; BORGES, T.; SILVA, M. J.	Revisão	<i>Nanomateriais manufaturados: novos desafios para a saúde pública.</i>	Revista Portuguesa de Saude Publica	-	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
66.	2012	LIN, H. et al	Revisão	<i>Current methods and research progress in nanomaterials risk assessment.</i>	Current Drug Metabolism	2.960	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
67.	2009	PARK, M. V.D.Z. et al.	Perspectiva	<i>The status of in vitro toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials.</i>	Nanomedicine	4.925	Avaliação e Testes de Segurança Biológica
68.	2018	ACCOMASSO, L.; CRISTALLINI, C.; GIACHINO, C.	Revisão	<i>Risk Assessment and Risk Minimization in Nanomedicine: A Need for Predictive, Alternative, and 3Rs Strategies.</i>	Frontiers in pharmacology	4.400	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
69.	2007	BALBUS, J. M. et al.	Relato	<i>Meeting report: hazard assessment for nanoparticles--report from an interdisciplinary workshop.</i>	Environmental health perspectives	8.38	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão

70.	2010	CANADY, R. A.	Revisão	<i>The uncertainty of nanotoxicology: report of a Society for Risk Analysis Workshop.</i>	Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis	4.000	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
71.	2016	ERBIS,S. et al.	Revisão	<i>Review of Research Trends and Methods in Nano Environmental, Health, and Safety Risk Analysis.</i>	Risk analysis	2.898	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
72.	2012	HWANG, M. et al.	Revisão	<i>Risk assessment principle for engineered nanotechnology in food and drug.</i>	Toxicol Res	2.283	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
73.	2008	LINKOV, I. et al.	Revisão	<i>Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions.</i>	Nanomedicine	4.3	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
74.	2012	HRISTOZOV, D.R. et al.	Revisão	<i>Risk assessment of engineered nanomaterials: a review of available data and approaches from a regulatory perspective.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
75.	2020	ISIGONIS, P. et al		<i>Risk Governance of Emerging Technologies Demonstrated in Terms of its Applicability to Nanomaterials.</i>	Small	11.459	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
76.	2013	JOHNSTON, H. et al	Revisão	<i>Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges.</i>	Critical Reviews in Toxicology	4.257	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
77.	2014	OOMEN, A.. et al.	Comentário	<i>Concern-driven integrated approaches to nanomaterial testing and assessment-report of the NanoSafety Cluster Working Group 10.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
78.	2015	WARHEIT, D.; DONNER, E.	Revisão	<i>How meaningful are risk determinations in the absence of a complete dataset? Making the case for publishing standardized test guideline and 'no effect' studies for evaluating the safety of nanoparticulates versus spurious 'high effect' results from single.</i>	Science and Technology of Advanced Materials	8.090	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
79.	2012	SOM, C. et al	Revisão	<i>Toward the development of decision supporting tools that can be used for safe production and use of nanomaterials.</i>	Accounts of Chemical Research	20.832	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
80.	2018	FADEEL, B. et al	Perspectiva	<i>Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials.</i>	Nature Nanotechnology	31.538	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
81.	2007	FADEEL, B. et al.	Revisão	<i>There's plenty of room at the forum: Potential risks and safety assessment of engineered nanomaterials.</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
82.	2009	GRIEGER, K. D. et al.	Revisão	<i>The known unknowns of nanomaterials: Describing and characterizing uncertainty</i>	Nanotoxicology	4.925	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão

					<i>within environmental, health and safety risks.</i>			
83.	2009	KROLL, A., et al.	Revisão		<i>Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges.</i>	European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	5.571	Avaliação de Riscos e Tomada de Decisão
84	2013	RAUSCHER, H.; SOKULL-KLÜTTGEN, B.; STAMM, H.	Editorial		<i>The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact.</i>	Nanotoxicology	4.925	Regulação
85.	2016	WACKER, M. et al	Revisão		<i>Dealing with nanosafety around the globe - Regulation vs. innovation.</i>	International Journal of Pharmaceutics	4.845	Regulação
86.	2020	KARAKUS, C.O.; BILGI, E.; WINKLER, D.A.	Revisão		<i>Biomedical nanomaterials: applications, toxicological concerns, and regulatory needs.</i>	Nanotoxicology	4.925	Regulação
87.	2020	SHIEKH, F.A., et al.	Editorial		<i>For (nano) rules and regulations: the learning curve.</i>	Nanomedicine	5.307	Regulação
88.	2012	WANG, J., et al.	Revisão		<i>Necessity and approach to integrated nanomaterial legislation and governance.</i>	Science of the Total Environment	7.963	Regulação
89.	2012	FORLONI, G.	Perspectiva		<i>Responsible nanotechnology development.</i>	J Nanopart Res	2.009	Regulação
90.	2009	-	Editorial		<i>Of mice and men. We need a systematic way to formulate and tackle problems in nanotoxicology, and to compare and combine the results from individual studies.</i>	Nature Nanotechnology	31.538	Desafios Nanotoxicológicos
91.	2020	AKÇAN, R.; ET AL.	Revisão		<i>Nanotoxicity: a challenge for future medicine.</i>	Turkish Journal of Medical Sciences	0.62	Desafios Nanotoxicológicos
92.	2012	ARORA, S.; RAJWADE, J. M. PAKNIKAR, K.M.	Revisão		<i>Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour.</i>	Toxicology and Applied Pharmacology	3.705	Desafios Nanotoxicológicos
93.	2018	DE MATTEIS, V.; RINALDI, R.	Revisão		<i>Toxicity assessment in the nanoparticle era.</i>	Advances in Experimental Medicine and Biology	2.450	Desafios Nanotoxicológicos
94.	2011	CLIFT, M. J.D; GEHR, P. ROTHEN-RUTISHAUSER, B.	Revisão		<i>Nanotoxicology: A perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative.</i>	archives of toxicology	5.609	Desafios Nanotoxicológicos
95.	2007	DROBNE, D.	Revisão		<i>Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology.</i>	Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju	1.727	Desafios Nanotoxicológicos
96.	2013	FADEEL, B.; ALENIUS, H.; SAVOLAINEN, K.	Editorial		<i>Nanotoxicology.</i>	Toxicology	4.1	
97.	2010	FAN, A. M.; ALEXEEFF, G	Revisão		<i>Nanotechnology and nanomaterials: Toxicology, risk assessment, and regulations.</i>	Journal of Nanoscience and Nanotechnology	1.134	Desafios Nanotoxicológicos

98.	2009	HIRANO, S.	Revisão	<i>A current overview of health effect research on nanoparticles.</i>	Environmental Health and Preventive Medicine	1.568	Desafios Nanotoxicológicos
99.	2014	HAMMAD, S.; BOLT, H. M.	Editorial	<i>Current developments in nanosafety research.</i>	Archives of Toxicology	5.059	Desafios Nanotoxicológicos
100.	2010	HAYNES, C. L.	Editorial	<i>The emerging field of nanotoxicology.</i>	Analytical and Bioanalytical Chemistry	3.286	Desafios Nanotoxicológicos
101.	2013	GEBEL, T.; MARCHAN, R.; HENGSTLER, J.G.	Editorial	<i>The nanotoxicology Revolution.</i>	Archives of Toxicology	5.059	Desafios Nanotoxicológicos
102.	2015	GEORGE, S. et al	Comentário	<i>The multi-facets of sustainable nanotechnology-Lessons from a nanosafety symposium.</i>	Nanotoxicology	4.925	Desafios Nanotoxicológicos
103.	2016	HOBSON, D. W.	Nota do editor convidado	<i>Nanotoxicology: The Toxicology of Nanomaterials and Nanostructures.</i>	International Journal of Toxicology	1.205	Desafios Nanotoxicológicos
104.	2015	KALANTARI, H.	Editorial	<i>Nanotoxicology.</i>	Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products	0.887	Desafios Nanotoxicológicos
105.	2018	KRAEGELOH, A.	Editorial	<i>Nanosafety Research-An Ongoing Story.</i>	Chemical Research in Toxicology	3.184	Desafios Nanotoxicológicos
106.	2019	KRUG, H.; KRAEGRLOH, A.	Editorial	<i>Nanosafety: Where Are We Now and Where Must We Go?</i>	Chemical Research in Toxicology	3.184	Desafios Nanotoxicológicos
107.	2020	KRUG, H.; KRAEGRLOH, A.	Editorial	<i>Special issue on "future nanosafety".</i>	Chemical Research in Toxicology	3.184	Desafios Nanotoxicológicos
108.	2014	LISON, D.; VIETTI, G.; VAN DEN BRULE, S.	Comentário	<i>Parecelsus in nanotoxicology.</i>	Particle and Fibre Toxicology	7.732	Desafios Nanotoxicológicos
109.	2011	LEHR, C. et al.	Prefácio	<i>Biological barriers--a need for novel tools in nanotoxicology and nanomedicine. Preface.</i>	European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	4.604	Desafios Nanotoxicológicos
110.	2011	LEE, S.B.	Prefácio	<i>Nanotoxicology: toxicity and biological effects of nanoparticles for new evaluation standards.</i>	Future Medicine	4.727	Desafios Nanotoxicológicos
111.	2009	OSTROWSKI, A. D., et al	Perspectiva	<i>Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007.</i>	J Nanopart Res	2.009	Desafios Nanotoxicológicos
112.	2016	ALKILANY, A.; ET AL.	Perspectiva	<i>Misinterpretation in Nanotoxicology: A Personal Perspective.</i>	Chemical Research in Toxicology	3.278	Desafios Nanotoxicológicos
113.	2015	AZH DARZADEH, M.; ET AL.	Revisão	<i>Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology.</i>	Nanomedicine (London, England)	4.727	Desafios Nanotoxicológicos
114.	2015	BHATTACHARJEE, S.; BRAYDEN, D. J.	Revisão	<i>Development of nanotoxicology: implications for drug delivery and medical devices.</i>	Nanomedicine	6.500	Desafios Nanotoxicológicos

115.	2007	FISCHER, H.C.; CHAN, W. CW.	Revisão	<i>Nanotoxicology: the growing need for in vivo study.</i>	Current Opinion in Biotechnology	8.288	Desafios Nanotoxicológicos
116.	2010	FELIU, N.; FADEEL, B.	Revisão	<i>Nanotoxicology: No small matter.</i>	Nanoscale	6.895	Desafios Nanotoxicológicos
117.	2018	KRUG, H. F.	Revisão	<i>The uncertainty with nanosafety: Validity and reliability of published data.</i>	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	3.997	Desafios Nanotoxicológicos
118.	2015	HUSSAIN, S.M et al.	Revisão	<i>At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges.</i>	3.703		Desafios Nanotoxicológicos
119.	2011	KRUG, H; WICK, P	Revisão	<i>Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge.</i>	Angewandte Chemie - International Edition	12.959	Desafios Nanotoxicológicos
120.	2016	MARCHESE, R.L. et al	Revisão	<i>How should the completeness and quality of curated nanomaterial data be evaluated?</i>	Nanoscale	7.12	Desafios Nanotoxicológicos
121.	2016	SHVEDOVA, A.; PIETROIUSTI, KAGAN, V.	Editorial	<i>Nanotoxicology ten years later: Lights and shadows.</i>	Toxicology and Applied Pharmacology	3.705	Desafios Nanotoxicológicos
122.	2020	SHATKIN, J. A.	Carta/Ponto de vista	<i>The Future in Nanosafety.</i>	Nano Letters	11.238	Desafios Nanotoxicológicos
123.	2020	YANG, W. et al.	Revisão	<i>Nanoparticle Toxicology.</i>	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	13.820	Desafios Nanotoxicológicos
124.	2017	BURDEN N. et al	Revisão	<i>Aligning nanotoxicology with the 3Rs: What is needed to realise the short, medium and long-term opportunities?</i>	Regulatory toxicology and pharmacology : RTP	2.652	Nanotoxicologia Preditiva
125.	2017	BAÑARES, M. et al	Destaques (conferência)	<i>CompNanoTox2015: novel perspectives from a European conference on computational nanotoxicology on predictive nanotoxicology.</i>	Nanotoxicology	4.925	Nanotoxicologia Preditiva
126	2020	AFANTITIS, A. et al.	Revisão/Relato	<i>NanoSolveIT Project: Driving nanoinformatics research to develop innovative and integrated tools for in silico nanosafety assessment</i>	Computational and Structural Biotechnology Journal	6.018	Nanotoxicologia Preditiva
127.	2011	CLARK, K.A.; WHITE, R. H.; SILBERGELD, E. K.	Comentário	<i>Predictive models for nanotoxicology: current challenges and future opportunities.</i>	Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP	2.652	Nanotoxicologia Preditiva
128.	2018	CHEN, S. et al	Revisão	<i>Intelligent testing strategy and analytical techniques for the safety assessment of nanomaterials.</i>	Analytical and bioanalytical chemistry.	3.286	Nanotoxicologia Preditiva
129.	2020	EDE, J. D. et al	Revisão	<i>Translating Scientific Advances in the AOP Framework to Decision Making for Nanomaterials.</i>	Nanomaterials (Basel, Switzerland)	4.034	Nanotoxicologia Preditiva

130.	2020	CLIFT, M.J.D.; JENKINS, G. J.S.; DOAK, S. H.	Conceito	<i>An Alternative Perspective towards Reducing the Risk of Engineered Nanomaterials to Human Health.</i>	Small	11.459	Nanotoxicologia Preditiva
131.	2015	COSTA, P. M.; FADEEL, B.	Revisão	<i>Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk.</i>	Toxicology and Applied Pharmacology	3.347	Nanotoxicologia Preditiva
132.	2015	FADEEL, B.	Editorial	<i>Systems biology in nanosafety research.</i>	Nanomedicine	4.300	Nanotoxicologia Preditiva
133.	2019	FOREST, V.; HOICHEPIED, J.; POURCHEZ, J.	Perspectiva	<i>Importance of Choosing Relevant Biological End Points To Predict Nanoparticle Toxicity with Computational Approaches for Human Health Risk Assessment.</i>	Chemical Research in Toxicology	3.278	Nanotoxicologia Preditiva
134.	2017	GAJEWICZ, A.	Revisão	<i>What if the number of nanotoxicity data is too small for developing predictive Nano-QSAR models? An alternative read-across based approach for filling data gaps.</i>	Nanoscale	6.895	Nanotoxicologia Preditiva
135.	2015	LAI, D.Y.		<i>Approach to using mechanism-based structure activity relationship (SAR) analysis to assess human health hazard potential of nanomaterials.</i>	Food and Chemical Toxicology	4.679	Nanotoxicologia Preditiva
136.	2020	MILOSEVIC, A., ROMEO, D., WICK, P.	Revisão	<i>Understanding Nanomaterial Biotransformation: An Unmet Challenge to Achieving Predictive Nanotoxicology.</i>	Small	12.02	Nanotoxicologia Preditiva
137.	2017	OKSEL, C. et al	Revisão	<i>Literature Review of (Q)SAR Modelling of Nanomaterial Toxicity.</i>	Advances in Experimental Medicine and Biology	2.450	Nanotoxicologia Preditiva
138.	2015	LV, M. et al	Revisão	<i>Metabolomics techniques for nanotoxicity investigations.</i>	Bioanalysis	2.371	Nanotoxicologia Preditiva
139.	2019	LAMON, L. et al	Revisão	<i>Grouping of nanomaterials to read-across hazard endpoints: a review.</i>	Nanotoxicology	4.925	Nanotoxicologia Preditiva
140.	2012	MAOJO, V. et al	Revisão	<i>Nanoinformatics: A new area of research in nanomedicine.</i>	International Journal of Nanomedicine	4.471	Nanotoxicologia Preditiva
141.	2014	MAHTO, S., et. Al.	Revisão	<i>Microfluidic platforms for advanced risk assessments of nanomaterials.</i>	Nanotoxxicology	4.925	Nanotoxicologia Preditiva
142.	2016	SHATKIN, J.; ONG, K.	Revisão	<i>Alternative Testing Strategies for Nanomaterials: State of the Science and Considerations for Risk Analysis.</i>	Society for Risk Analysis	3.137	Nanotoxicologia Preditiva
143.	2017	RIEBELING, C. et al	Revisão	<i>Systems biology to support nanomaterial grouping.</i>	Advances in Experimental Medicine and Biology	2.450	Nanotoxicologia Preditiva

144.	2012	WINKLER, D. et al	Revisão	<i>Applying quantitative structure–activity relationship approaches to nanotoxicology: Current status and future potential.</i>	Toxicology	4.1	Nanotoxicologia Preditiva
145.	2015	TANTRA, R. et al	Revisão	<i>Nano(Q)SAR: Challenges, pitfalls and perspectives.</i>	Nanotoxicology	5.47	Nanotoxicologia Preditiva
146.	2016	WINKLER, D.	Revisão	<i>Recent advances, and unresolved issues, in the application of computational modelling to the prediction of the biological effects of nanomaterials.</i>	Toxicology and Applied Pharmacology	3.705	Nanotoxicologia Preditiva
147.	2014	ÖZEL, R. E. et al.	Revisão	<i>Electrochemical Methods for nanotoxicity Assessment.</i>	TrAC - Trends in Analytical Chemistry	9.801	Nanotoxicologia Preditiva
148.	2020	PIKULA, K. et al.	Revisão	<i>Risk assessments in nanotoxicology: bioinformatics and computational approaches.</i>	Current Opinion in Toxicology	4.05	Nanotoxicologia Preditiva