

Exposição ocupacional a nanofibras por via respiratória e potencial impacto na saúde Occupational respiratory exposure to nanofibers and its potential health impact

Célia Ventura^{1,2,3}, Henriqueta Louro^{1,3}, António Sousa-Uva², Maria João Silva^{1,3}

celia.ventura@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Departamento de Saúde Ocupacional e Ambiental. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

_Resumo

Com a generalização da produção e incorporação de nanofibras em diversos produtos para consumo humano, prevê-se o aumento considerável da exposição humana a estes nanomateriais, particularmente em contexto ocupacional. Isto intensifica a preocupação de que as propriedades singulares das nanofibras possam conduzir a efeitos nefastos no organismo. De facto, estudos anteriores sobre aerossóis ultrafinos, poluição atmosférica e fibras minerais e nanofibras, têm demonstrado que algumas delas têm o potencial de causarem efeitos adversos na saúde humana, nomeadamente ao nível de desenvolvimento de doença respiratória. É o caso da exposição por via inalatória aos nanotubos de carbono, em que vários estudos laboratoriais demonstraram possível citotoxicidade, genotoxicidade e imunotoxicidade, bem como o desenvolvimento de inflamação pulmonar, fibrose intersticial com granulomas e efeitos carcinogénicos em modelos animais. Por outro lado, outras nanofibras aparentam a inexistência de efeitos tóxicos, como a nanocelulose, provavelmente biocompatível e com características prometedoras para várias aplicações em biomedicina. O conhecimento dos efeitos tóxicos das nanofibras representa um contributo importante para a avaliação do efeito na saúde decorrente da exposição ocupacional, por forma a permitir a gestão do risco pelas autoridades regulamentares.

_Abstract

With the widespread production and application of nanofibers into various products, a considerable increase of human exposure to these nanomaterials is expected, particularly in the occupational setting and by inhalation. This intensifies the concern about the deleterious effects of nanofibers on biological systems. Previous studies on ultrafine aerosols, atmospheric pollution and manufactured mineral fibres and nanofibers have demonstrated that some can cause adverse effects on human health, namely, the development of respiratory disease. This potential was observed for carbon nanotubes, for which several in vitro studies have demonstrated possible cytotoxicity, genotoxicity and immunotoxicity, with the development of pulmonary inflammation, interstitial fibrosis with granulomas, as well as carcinogenic effects in animal models. On the other hand, other nanofibers suggest the absence of toxic effects, such as nanocellulose, a promising biocompatible material for several applications in biomedicine. The knowledge of nanofibers toxic effects represents an important contribution to the health effects from exposure in occupational settings, in order to allow risk management by the regulatory authorities.

_Inovação tecnológica e exposição ocupacional a nanofibras

As nanofibras são nanopartículas que se caracterizam por terem duas das suas dimensões inferiores a 100nm e uma terceira significativamente superior (1). Nesta definição englobam-se nanofibras muito distintas, como os nanotubos de carbono (NTC) e as nanofibras de celulose (NFC). Uma singularidade muito interessante dos nanomateriais, em geral, e das nanofibras, em particular, relaciona-se com o facto das suas propriedades físico-químicas serem únicas e determinarem a sua aplicabilidade em domínios muito vastos da ciência e tecnologia. Os NTC têm encontrado inúmeras aplicações em revestimentos e eletrónica, entre outros. As NFC, por sua vez, indicam ser um material biocompatível e adequado para aplicações em biomedicina, como em medicina regenerativa, membranas de hemodiálise e sistemas estáveis de administração sustentada de fármacos (2).

Os avanços contínuos que têm ocorrido na produção e incorporação de nanofibras em diversos produtos fazem prever o aumento considerável da exposição humana a estes nanomateriais, principalmente num contexto ocupacional. A *National Science Foundation* estimou que, em 2020, a nanotecnologia tenha um impacto de \$3 trilhões na economia global e que empregue 6 milhões de trabalhadores na manufatura de produtos baseados em nanomateriais (3). Atualmente, de acordo com o princípio da precaução, várias organizações científicas e profissionais concluíram existir informação preliminar suficiente para que os nanomateriais, entre os quais as nanofibras, sejam considerados um fator de risco para a saúde pública em termos de possível doença pulmonar de origem ocupacional (4). Por este motivo, o *National Institute for Occupational Safety and*

Health (NIOSH) dos Estados Unidos da América apresentou, como plano estratégico de investigação e orientação para os anos de 2013-2016, a proteção dos trabalhadores das nanotecnologias (5). Em Portugal, no sentido de se conhecer a realidade nacional, o consórcio PTONANO (www.ptonano.pt), uma parceria estabelecida entre o Instituto de Soldadura e Qualidade, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, o Instituto Português da Qualidade e a Direção-Geral da Saúde, desenvolveu esforços para identificar laboratórios e indústrias associados à síntese, produção ou utilização de nanomateriais ao nível nacional.

No contexto ocupacional, tanto a absorção de nanofibras por via inalatória como por via transdérmica são possíveis, sendo que a absorção gastrointestinal resulta do transporte

mucociliar de nanofibras inaladas em caso de acidentes ou quando as normas de higiene não são cumpridas (6). Após a inalação e deposição das nanofibras no epitélio pulmonar, estas podem interagir com os macrófagos, podendo ser eliminadas, ou atingir o interstício e os fibroblastos e células endoteliais. Aqui, é possível que se distribuam a outras partes do corpo, onde podem interagir com as células e tecidos alvo, incluindo as células do sistema imunitário (6). As fases mais críticas em termos de exposição ocupacional aos nanomateriais vão desde a sua produção e transporte, até à sua incorporação em matrizes e libertação das mesmas após trabalho mecânico (7). No seu manual de boas práticas para a avaliação do risco dos nanomateriais no local de trabalho, o *Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail* (IRSST) do Canadá recomenda a implementação

Quadro 1: Resumo das recomendações do *Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail* para prevenir a exposição ocupacional a nanofibras (7).

Tipo de nanofibra	Tipo de empresa	Fontes de Exposição	Tamanho das Partículas no Ar (nm)	Controlos	Recomendações específicas baseadas nas leituras das emissões nos postos de trabalho
Nanocelulose	Investigação/ Produção	Esmerilhação Produção Peneiramento Limpeza	[5-40]	Hotte	Reter os nanomateriais na origem Reparar e manter a ventilação geral Seguir as recomendações de utilização de hottes Alterar práticas de trabalho Estabelecer um programa de proteção respiratória
Nanotubos de carbono de parede simples	Produtor	Recolha Limpeza	[200-10,000]	Hotte Confinamento do local de produção Vestiário adjacente à área de trabalho Proteção respiratória (FPA=100)	Seguir as recomendações de utilização de hottes Rever o programa de proteção respiratória e realizar testes de estanquidade
Nanotubos de carbono de parede múltipla	Investigação/ Integração	Homogeneização Análise térmica Fresagem	[24-500]	Caixa de luvas (Glove box) Proteção respiratória (FPA=10)	Mudar de luvas na caixa de luvas Fazer a homogeneização numa hotte Modificar práticas de polimento e serragem Manter o programa de proteção respiratória
Nanofibras de carbono	Investigação/ Integração	Recolha Limpeza	[100-400]	Área contida Vestiário duplo, adjacente à área de trabalho Hotte Ventilação geral (20 renovações de ar/h) Proteção respiratória (FPA=25-1,000)	Seguir as recomendações de utilização de hottes Modificar a sequência de saída dos vestiários Manter o programa de proteção respiratória

FPA: Fator de proteção atribuído.

de uma estratégia preventiva e feita caso-a-caso, tendo em consideração a avaliação do risco associado a cada posto de trabalho (7). As medidas preventivas recomendadas estão descritas no quadro 1.

Apesar destas recomendações, são necessários estudos de biomonitorização ao nível ocupacional. Contudo, a enorme heterogeneidade das nanofibras dificulta a constituição de coortes para estudos epidemiológicos e o equipamento e metodologia de amostragem e caracterização de nanofibras para monitorização ambiental é muitas vezes insuficiente (8). Além disso, na maioria dos casos, ainda não decorreu um período de tempo suficientemente extenso para permitir o estudo de eventuais efeitos crónicos decorrentes da exposição (4,8). Como tal, a definição convencional de valores limite de exposição é difícil. Os NTC são uma exceção, tendo o NIOSH recomendado como limite de exposição uma concentração média de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de carbono elementar em 8 horas de trabalho (9).

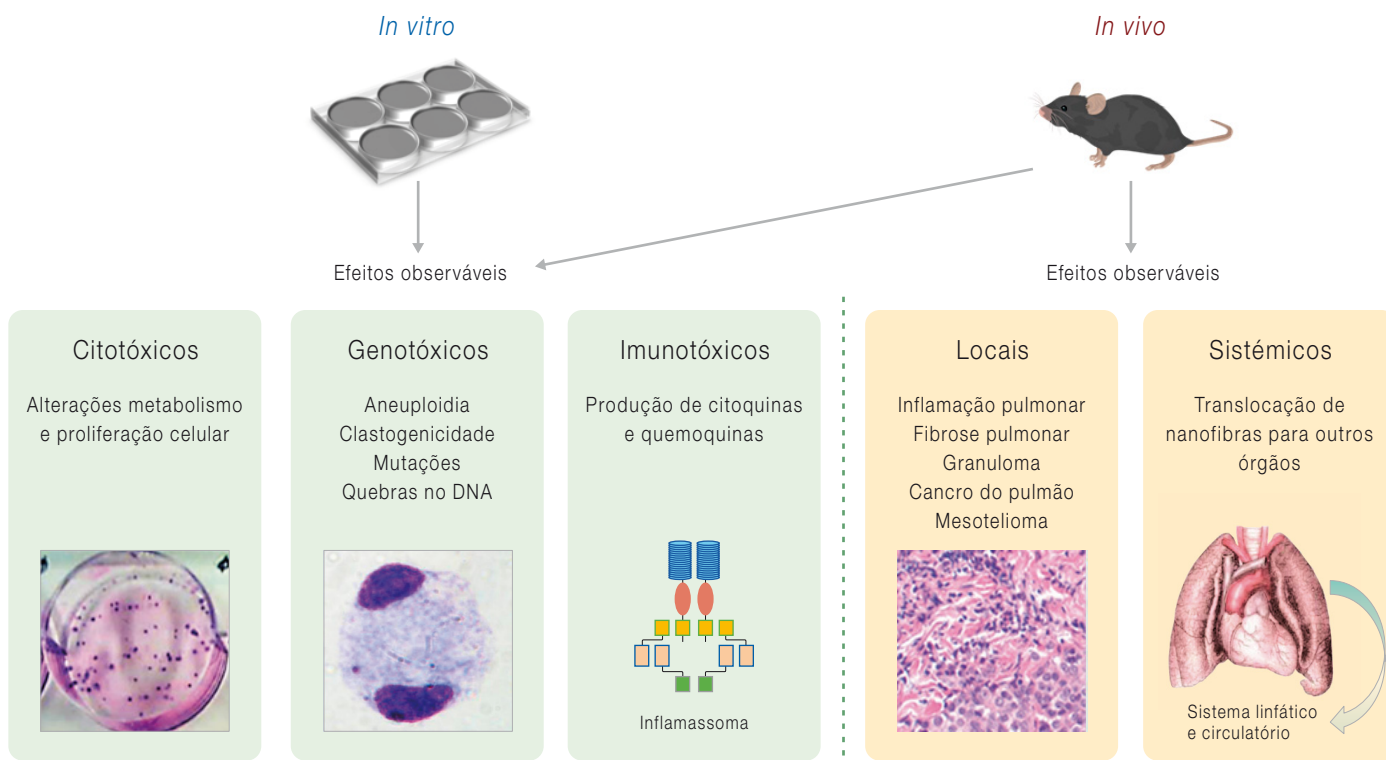
_Estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo*

Inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* têm vindo a demonstrar que algumas nanofibras podem ser um potencial fator de risco para a saúde, sendo os NTC as nanofibras mais estudadas. Nos últimos anos, foram vários os estudos com suspensões líquidas de NTC administradas em modelos murinos por instilação intra-traqueal ou aspiração faríngea onde se observou o desenvolvimento de inflamação pulmonar aguda ou persistente, fibrose intersticial, com a formação de granulomas, e hiperplasia brônquica e bronco-alveolar (10). Os estudos toxicológicos *in vitro* também demonstraram possíveis efeitos imunotóxicos, citotóxicos e genotóxicos para alguns NTC (11-13), que têm vindo a ser relacionados com as suas propriedades intrínsecas, principalmente com a sua razão de aspeto, área de superfície, cristalinidade e estado de dispersão (14-16). Isto implica que seja necessário caracterizar individualmente a toxicidade de cada nanofibra e relacioná-la com as propriedades físico-químicas inerentes, embora seja previsível que alguns conceitos possam ser generalizáveis, permitindo a sua categorização em grupos de risco (17). Por exemplo, foi já demonstrado que a dimensão, durabilidade e dose das partículas fibrosas são parâmetros

determinantes da toxicidade e patogenicidade das nanofibras, embora outras características, tais como a solubilidade, reatividade da superfície e carga possam também influenciar esses efeitos (18).

Relativamente ao potencial carcinogénico dos NTC, apenas o NTC de parede múltipla MWCNT-7 foi classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como possivelmente carcinogénico (Grupo 2B) (19). Este NTC induziu mesotelioma após injeção intraperitoneal em ratinhos e ratos (20-22) e injeção intraescrotal em ratos (23). Além disso, promoveu a progressão neoplásica de células pulmonares de ratinho previamente expostas a metilcolantreno, causando adenomas e adenocarcinomas broncoalveolares em doses atingíveis em contexto ocupacional (24). Os diversos efeitos adversos observáveis nos ensaios toxicológicos após a exposição a NTC encontram-se esquematizados na figura 1. Pelo contrário, outras nanofibras, como as NFC, aparentam não ser citotóxicas, genotóxicas ou imunotóxicas, embora os estudos ainda sejam algo limitados (2).

Figura 1: ⬇ Efeitos adversos caracterizados nos ensaios toxicológicos realizados em células pulmonares (*in vitro*) e em modelos animais (*in vivo*) expostos a nanofibras. Para alguns NTC foi observado o desenvolvimento destes efeitos tóxicos, enquanto para as NFC não foi observado, até à data, nenhum efeito significativo.



_Conclusões

As nanofibras são um nanomaterial inovador e com um elevado impacto na indústria, tecnologia e biomedicina. Contudo, desconhecem-se os seus potenciais efeitos na saúde humana, principalmente ao nível respiratório.

Os resultados obtidos *in vitro* e em modelos animais permitem conhecer os possíveis mecanismos patogénicos desencadeados pela exposição a nanofibras por via inalatória.

Para além disso, poderão permitir a identificação de biomarcadores de exposição ou efeito, aplicáveis na avaliação e gestão do risco associado à exposição ocupacional, previamente ao aparecimento de sintomas.

Agradecimentos:

Trabalho cofinanciado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Centro de Investigação em Toxicogenómica e Saúde Humana – ToxOmics (UID/BIM/00009/2013) e pelo INSA (2017DGH1351).

Referências bibliográficas:

- (1) International Organization for Standardization. ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies-Vocabulary-Part 2: Nano-objects.
- (2) Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. Eur Polym J 2014; 59, 302-25.
- (3) Roco MC, Hersam MC, Mirkin CA. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: retrospective and outlook. New York: Springer, 2011, pp. 159-220. (Science Policy Reports; 1).
- (4) Trout DB, Schulte PA. Medical surveillance, exposure registries, and epidemiologic research for workers exposed to nanomaterials. Toxicology. 2010;269(2-3):128-35. Epub 2009 Dec 16.
- (5) National Institute for Occupational Safety and Health. Protecting the nanotechnology workforce: NIOSH nanotechnology research and guidance strategic plan, 2013–2016. Cincinnati, OH: NIOSH, 2013. (DHHS (NIOSH) Publication;2014-106). www.cdc.gov/niosh/docs/2014-106/pdfs/2014-106.pdf

- (6) Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, et al.; ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2005;2:8. www.particleandfibretoxicology.com/content/2/1/8
- (7) Ostiguy C, Debia M, Roberge B, et al. Best Practices Guidance for Nanomaterial Risk Management in the Workplace. 2nd ed. Québec: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail, 2015. (Chemical and Biological Hazard Prevention; Studies and Research Projects R-899). www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/R-899.pdf?v=2017-07-12
- (8) Liou S-H, Tsou T-C, Wang S-L, et al. Epidemiological study of health hazards among workers handling engineered nanomaterials. *J Nanopart Res.* 2012;14(878).
- (9) National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH Current intelligence bulletin 65 - Occupational Exposure to Carbon Nanotubes and Nanofibers. Cincinnati, OH: NIOSH, 2013. (DHHS (NIOSH) Publication;2013-145). www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/pdfs/2013-145.pdf
- (10) Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, et al. Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung: one year postexposure comparisons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(2):L170-82. Epub 2013 Nov 8. <http://ajplung.physiology.org/content/306/2/L170.long>
- (11) Siegrist KJ, Reynolds SH, Kashon ML, et al. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at occupationally relevant doses. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:6. www.particleandfibretoxicology.com/content/11/1/6
- (12) Muller J, Decordier I, Hoet PH, et al. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2008;29(2):427-33.
- (13) Kisin ER, Murray AR, Sargent L, et al. Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;252(1):1-10. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3014234/
- (14) Jackson P, Kling K, Jensen KA, et al. Characterization of genotoxic response to 15 multi-walled carbon nanotubes with variable physicochemical properties including surface functionalizations in the FE1-Muta(TM) mouse lung epithelial cell line. *Environ Mol Mutagen.* 2015;56(2):183-203. Epub 2014 Nov 12.
- (15) van Berlo D, Wilhelmi V, Boots AW, et al. Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multi-walled carbon nanotubes in mouse lung. *Arch Toxicol.* 2014;88(9):1725-37.
- (16) Louro H, Pinhão M, Santos J, et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physicochemical properties. *Toxicol Lett.* 2016;262:123-34.
- (17) Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med.* 2010;267(1):89-105. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x>
- (18) Lanone S, Andujar P, Kermanzadeh A, et al. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2063-9.
- (19) Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, et al.; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1427-8.
- (20) Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, et al. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(49):E1330-8. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3241783/
- (21) Takagi A, Hirose A, Nishimura T, et al. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.* 2008;33(1):105-16. www.jstage.jst.go.jp/article/jts/33/1/33_1_105/_article
- (22) Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, et al. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* 2012;103(8):1440-4. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569866/
- (23) Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, et al. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 2009;34(1):65-76. www.jstage.jst.go.jp/article/jts/34/1/34_1_65/_article
- (24) Sargent LM, Porter DW, Staska LM, et al. Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:3. www.particleandfibretoxicology.com/content/11/1/3