

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ANA CLARA SILVA STIVAL

**INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMOS DE MORTE
CELULAR DE E-LÍQUIDOS**

Goiânia
2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC nº 1204/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG):

Nome completo do autor: Ana Clara Silva Stival

Título do trabalho: INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMOS DE MORTE CELULAR DE E-LÍQUIDOS

2. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF do TCCG.

Ana Clara Silva Stival
(Ana Clara Silva Stival)²

Marize Campos Valadares
Ciente e de acordo, junto de Toxicologia
Faculdade de Farmácia / UFG

(Marize Campos Valadares)²

Data: 08 / 12 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

ANA CLARA SILVA STIVAL

**INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMOS DE MORTE
CELULAR DE E-LÍQUIDOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de
Goiás para a obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marize Campos Valadares

Goiânia
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva Stival , Ana Clara
INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMOS
DE MORTE CELULAR DE E-LÍQUIDOS [manuscrito] / Ana Clara
Silva Stival . - 2020.
XLV, 45 f.

Orientador: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Física, Goiânia, 2020.
Bibliografia.
Inclui fotografias, abreviaturas, lista de figuras.

1. E-líquido. 2. Modelo Alveolar 3D. 3. A549. 4. Flavorizantes. 5.
Cigarro Eletrônico. I. Campos Valadares, Marize , orient. II. Título.

CDU 615



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA



ANA CLARA SILVA STIVAL

INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMOS DE MORTE
CELULAR DE E-LÍQUIDOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal
de Goiás para a obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia

Data da aprovação: 08/12/2020

Membros da Banca:

Marize Campos Valadares
Profª Dra. Adjunto de Toxicologia
Faculdade de Farmácia / UFG

Profª. Drª. Marize Campos Valadares
Orientadora
Universidade Federal de Goiás

Msc. Thaís Rosa Marques dos Santos
Universidade Federal de Goiás

Msc. Jordana Andrade Santos
Universidade Federal de Goiás

*Dedico este trabalho à minha família, Vitor
Cezar Stival, Maria de Fátima F. S. Stival e
Maria Luiza S. Stival.*

AGRADECIMENTOS

O reconhecimento e declaração é em primeiro lugar à Deus. Em uma oração muito particular entreguei absolutamente tudo ao Senhor. A partir desse momento Ele conduziu cada encontro, desencontro, desafio, pedras, questionamentos e certezas. Duvidei inúmeras vezes de mim, da minha capacidade e inevitavelmente dos projetos de Deus para a minha vida. Ele, entretanto, como a própria sabedoria, me mostrou com carinho e amor que nada disso importava. A faculdade foi um presente Dele para mim..

Aos meus familiares, obrigada pelo incentivo todos os dias, pelo amor, dedicação, atenção, disposição, afeto e principalmente por serem vocês. Vitor, Fátima e Maria Luiza uma vida inteira não seria capaz de agradecer por tudo. Espero honrar tudo o que vocês fizeram por mim. Vocês me fizeram estar sempre mais próxima do amor de Deus.

Aos meus amigos, muito obrigada pelo carinho, amor e empenho em manter a amizade mesmo a distância. Aline, Michele, Karina, Cristiane, Izabella Mariana (desde o primeiro dia), Bryna (desde o primeiro dia), Danielly, Mariana Arraes (da graduação para o mestrado), Victória, Marcos Antônio e Mandy. Vocês tornaram os dias mais alegres e cheios de esperança.

À Professora Dra Vanessa G. Pasqualotto Severino pela primeira oportunidade na Iniciação Científica. Obrigada Professora pelo tempo e paciência. Sou grata pela exigência, que me permitiu melhorar e seguir em busca de melhorar e sempre tirar ensinamentos de resultados não esperados.

Ao grupo Tox In (Toxicologia In Vitro) coordenado pela Professora Dra Marize Valadares obrigada pelo carinho que me receberam e pelos ensinamentos que me permitiram ser a pessoa que sou hoje.

À Professora Marize muito obrigada pela sua dedicação que me permitiu viver a experiência de fazer parte de um grupo de pesquisa único nesse país e principalmente, obrigada por acreditar no meu trabalho e dedicação. Obrigada professora, pela oportunidade de fazer parte da sua história, em ser orientada pela senhora e por todos os cafés regados a conselhos. O seu tempo foi um dos presentes mais sinceros, tenho uma profunda admiração pela senhora.

As minhas amigas, Lara Brito, Larissa Cleres, Tatyane Hayasaki e Thaís Rosa, obrigada pelos pães com leite condensado, cafés, bolos, viagem e principalmente pela amizade. Os ensinamentos de vocês me acompanham todos os dias. O apoio de vocês foi incondicional para tudo isso. Ao querido Artur Christian obrigada pela amizade, parceria, conversas, cafés e o apoio. Obrigada por tanto carinho e gentileza.

À Thaís Rosa por ter acreditado em mim e enxergando um potencial que para mim ainda era desconhecido. Sou muito grata por todos os conselhos, todo o cuidado e o tempo disposto à mim. Obrigada pelo carinho.

À toda equipe FARMATEC, coordenada pela Professora Doutora Eliana Martins, obrigada pelo suporte. Aos meus queridos: Emílio Cintra, Zé (Luís Antônio), Marcília, Mariana Arraes (Mariana da Ana), Tácio Hayasaki, Edilson Junior e Professora Danielle Diniz. Os almoços ganharam um novo significado com vocês.

À Fernanda Bellato por me acolher como parte do grupo antes mesmo de ser. Os almoços e cafés foram mais alegres com você.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito citotóxico obtidos por MTT, após o tratamento das células em monocamada, com e-líquido sabor menta por 24 horas. A) concentração de 0 mg de nicotina B) concentração de 3 mg de nicotina e C) concentração 5 mg de nicotina.....	29
Figura 2: Efeito citotóxico obtidos por MTT, após o tratamento das células em monocamada, com e-líquido sabor baunilha por 24 horas. A) concentração de 0 mg de nicotina B) concentração de 3 mg de nicotina.....	30
Figura 3: Efeitos citotóxico avaliado por redução do MTT após exposição de essência de baunilha por 24 horas das células em monocamada de A549.....	31
Figura 4: Viabilidade do modelo alveolar 3D frente a exposição pela Vitrocell® Cloud da solução de propilenoglicol e glicerol (CV) e e-líquido (EL). (A) concentração de 25% e (B) concentração de 35%.	32
Figura 5: Viabilidade do modelo alveolar 3D frente a exposição da essência de baunilha pela câmara Vitrocell® Cloud.....	32
Figura 6: Fotomicrografias do modelo alveolar epitelial 3D, após a exposição de 24 horas dos tecidos a essência de baunilha. Imagens obtidas após coloração dos cortes por Hematoxilina-eosina, sendo adquiridos em microscópio óptico em objetiva de 40x.....	33

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVEATURAS

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
2D	Bidimensional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP	“ <i>Adverse Outcome Pathway</i> ” – Via de efeito adverso
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CC	Controle
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular
CV	Concentração do Veículo (Propilenoglicol e Glicerol)
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EL	Concentração de e-líquido
EVALI	<i>E-cigarette use-associated lung injury</i>
FDA	“ <i>Food and Drug Administration</i> ” – Agência para Alimentos e Drogas
HAM- F12	Meios “ <i>Nutrient Mixture F-12 Ham</i> ”
MCT	Triacilglicerol de cadeia média
Meio OCT	“ <i>Optical Cutting Temperature</i> ” – Temperatura ideal de corte
Modelo 3D	Modelo alveolar epitelial tridimensional
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OCDE	“ <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> ” – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	“ <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ” – Tampão Fosfato Salino
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
THC	Tetrahydrocannabinol
VEA	Acetato de Vitamina E
HE	Eosina e hematoxilina

INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMOS DE MORTE CELULAR DE E-LÍQUIDOS

Ana Clara Silva **Stival**¹, Thaís Rosa **Marques**², Artur Christian Garcia da **Silva**², Tatyane Gonçalves **Hayasaki**², Marize Campos **Valadares**²

RESUMO

O cigarro eletrônico é um produto de tabaco que desde 2007 está de forma avassaladora atingindo mais jovens. O refil desse produto conhecido como e-líquido, possui composição, propilenoglicol e ou glicerol, nicotina e flavorizantes, e por meio da bateria acoplada produz os aerossóis que são inalados. Assim como a OMS, a ANVISA, não consente com a venda e importação desse produto devido à falta de estudos que comprovem a segurança para os usuários. O objetivo desse trabalho foi avaliar o produto e-líquido (produto comercial) de dois sabores, duas marcas e diferentes concentrações de nicotina, o veículo (propilenoglicol 70% e glicerina 30%) e a essência de baunilha, que na literatura apresentava-se com toxicidade importante. Utilizou-se método inovador com a exposição por meio do Vitrocell® Cloud 12 system no modelo alveolar epitelial 3D em comparação com o modelo clássico em monocamada. Para a avaliação da viabilidade celular utilizou-se o método de redução do MTT. Sendo nos ensaios em monocamada o e-líquido de menta com concentração de nicotina de 0 mg, 3 mg, 5 mg apresentou CI_{50} de 2,482%, 2,046% e 0,55% respectivamente, enquanto que, para o e-líquido de baunilha de 0 mg de nicotina obteve-se uma estimativa da concentração para identificação do CI_{50} e para o produto de 3 mg de nicotina a concentração foi de 0,4160%. Para a essência de baunilha definiu-se 5 mg/mL como CI_{50} . Já no modelo alveolar epitelial 3D, a concentração de 3,54 mg/mL da essência de baunilha no modelo 3D reduziu a viabilidade em 30%, enquanto que, o e-líquido e a solução do veículo (propilenoglicol e glicerol) se mostraram inertes frente a avaliação da viabilidade celular. As alterações morfológicas evidenciadas pela coloração em H.E mostrou uma inconstância tecidual, maior número de camada celular e descamação da camada mais externa para os tecidos tratados com essência de baunilha na concentração de 3,54 mg/mL. Os resultados encontrados permitem à extrapolação da ação sobre a ação do produto comercial e seus componentes, entretanto é necessário padronizar o produto.

PALAVRAS-CHAVE: e-líquido; modelo alveolar 3D; A549; flavorizantes; cigarro eletrônico; essência de baunilha

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC POTENTIAL AND E-LIQUID CELL DEATH MECHANISMS

Ana Clara Silva **Stival**¹, Thaís Rosa **Marques**², Artur Christian Garcia da **Silva**², Tatyane Gonçalves **Hayasaki**², Marize Campos **Valadares**²

ABSTRACT

The cigarette is a product of tobacco since 2007 overwhelmingly reaching more young people. The refill this product is e-juice, your composition is propylene glycol and or glycerol, nicotine, flavoring, that through of battery coupled produces aerosols that are inhaled. As WHO, the ANVISA, not consent with the sale and import of that product due to the lack of studies that prove safety for users. The aim of this study was to evaluate the product e-liquid (commercial product) of two flavors, two brands, and different concentrations of nicotine, propylene glycol 70 and glycerol 30 and flavor of vanilla, which in the literature presented with significant toxicity. An innovative method was used with exposure through the Vitrocell® Cloud 12 system in the epithelial alveolar model 3D. For the evaluation of cell viability using the MTT assay. The e-liquid of menthol with nicotine concentration 0 mg, 3 mg, 5 mg the IC₅₀ was: 2.482%, 2.046% e 0.55% respectively. While the e-liquid of vanilla with nicotine concentration 0 mg, 3 mg, the IC₅₀ was greater than that tested and 0.4160% respectively and the flavor of vanilla was 5 mg/ mL. The concentration of 3.54 mg/mL of flavor vanilla was tested on epithelial alveolar model 3D and reduced 30% of viability. The histological changes observed by coloring HE, showed a tissue inconstancy, more number greater number of cell layers, and peeling of the outermost for the tissue treated with the flavor of vanilla in concentration the 3.54 mg/mL. The results founded to allow the amplification of the view on the commercial products and their components, however, it is necessary to standardize the product.

KEYWORDS: e-liquid, 3D model, flavoring, electronic cigarette, vanilla

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CIGARRO ELETRÔNICO	14
1.2	O SISTEMA RESPIRATÓRIO	16
1.3	DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA RESPIRATÓRIO	18
1.3.1	EVALI ou lesão pulmonar associada ao uso de cigarro eletrônico	19
1.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA O SISTEMA RESPIRATÓRIO	20
2	OBJETIVO	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	CULTIVO CELULAR.....	23
3.2	PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS TESTE.....	23
3.2.1	E-líquido completo	24
3.2.1.1	E-líquido de menta	24
3.2.1.2	E-líquido de baunilha	24
3.2.2	Essência de baunilha	25
3.2.3	Veículo Propilenoglicol e glicerol	25
3.3	AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS A549	25
3.3.1	Método de redução do sal de tetrazólio (MTT)	25
3.4	CONSTRUÇÃO DO MODELO 3D DE EPITÉLIO ALVEOLAR.....	26
3.5	EXPOSIÇÃO DOS MODELOS 3D A AEROSSÓIS.....	26
3.6	AVALIAÇÃO DO MODELO ALVEOLAR EPITELIAL 3D APÓS A EXPOSIÇÃO DA SUBSTÂNCIA TESTE	27
3.6.1	Avaliação da viabilidade pela redução do sal de tetrazólio – MTT	27
3.6.2	Análise morfológica	27
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4	RESULTADOS	29

4.1	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PELA REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO – MTT	29
4.1.1	Monocamada de células A-549 frente à exposição de e-líquido sabor menta e baunilha.....	29
4.1.2	Monocamada de células A-549 frente a exposição a essência de baunilha	30
4.1.3	Modelo alveolar epitelial 3D frente à exposição do e-líquido e mistura de propilenoglicol e glicerol	31
4.1.4	Modelo alveolar epitelial 3D frente a exposição da essência de baunilha	32
4.1.5	Avaliação morfológica por histologia com coloração em HE após a exposição do modelo alveolar epitelial 3D à essência de baunilha.....	33
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 CIGARRO ELETRÔNICO

Cigarro eletrônico é um dispositivo constituído por com refil e atomizador que utiliza uma bateria para aquecer a mistura disposta no cartucho até a vaporização (FARSALINOS *et al.*, 2014). Os usuários desse dispositivo recebem o nome de *vapers* ou vaporizadores. Também conhecidos como e-cigarettes, ENDS ou ENNDS (*do inglês Eletronic Nicotine Deliveru Systems and Eletronic Non-Nicotine Delivery Systems*) podem parecer um produto inovador, contudo, o registro da patente do produto foi feito por Helbert A. Gilbert no ano de 1963, na Pensilvânia. Já nos anos 2000, o farmacêutico chinês Hon Lik aperfeiçoou-o dispositivo para a forma como é conhecido hoje (ZHU *et al.*, 2014). O produto possui o objetivo de entregar o principal ativo: a nicotina. Retirada da folha de tabaco, a nicotina, na forma de aerossol (GRANA, 2013) tem como intuito substituir o cigarro convencional de tabaco (ZHU *et al.*, 2014). O mercado digital do produto foi alcançado em 2007, e primeiramente introduzido ao mercado Norte Americano (ZHU *et al.*, 2014).

A evolução do dispositivo passou por três gerações, que pode ter sido incentivado pelo aperfeiçoamento das baterias de celular, visto que o melhoramento da tecnologia produziu baterias mais eficientes e capazes de vaporizar um fluxo do refil (HARTUNG, 2016). A primeira geração do dispositivo não era recarregável, sendo, portanto, descartável. A segunda geração, apresentava bateria recarregável assim como os cartuchos. Atualmente, os dispositivos estão na terceira geração, em que o design deixa de ser semelhante ao cigarro convencional. Outra diferença, está na substituição do reservatório para a recarga dos refis assim como na possibilidade de ajuste de voltagem e potência. (HUTZLER *et al.*, 2014; FARSALINOS, 2014; GIVENS, 2014; GRANA, 2014). O e-líquido ou *e-juices*, como é conhecida a solução de recarga, é composto por nicotina, propilenoglicol e ou glicerina, podendo ou não conter flavorizantes (HARTUNG, 2016). O propilenoglicol e glicerina, presentes no e-líquido, apresentam-se como veículos, com diferentes concentrações podendo a proporcionalidade entre os veículos ser de: 80:20, 70:30, 55:45 e 40:60 (DAVIS, 2015). Ambos são comumente utilizados na indústria alimentícia. Além destes, existem ainda etilenoglicol, MCT (Triacilglicerol de cadeia média), acetato de vitamina E (VEA), tolueno e 1,3 propanodiol, que podem ser encontrados nos mais diversos tipos de e-líquidos, sendo a associação de

propilenoglicol 400, MCT e VEA, encontrados em produtos à base de *cannabis* (PHILIIPS, *et al.*, 2017; HANH *et al.*, 2014, FDA, 2020).

A nicotina, um dos componentes do e-líquido e do cigarro convencional, é um alcaloide estimulante do sistema nervoso central, habitualmente encontrada com concentração variável de 0 até 36 mg/mL nos produtos e-líquidos (DUTRA *et al.*, 2016). O mecanismo de ação dessa substância, segundo a *Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein no artigo Álcool e Drogas sem Distorção* de 2009, está diretamente ligado ao sistema de recompensa do sistema mesolímbico dopaminérgico atuando nas vias excitatórias para liberação de dopamina e na via inibitória do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico). A ação sobre a via excitatória leva a uma sensação de prazer, de melhora no desempenho cognitivo, diminuição do apetite e ansiedade, enquanto que, na via gabaérgica, há a intensificação desse prazer em um reforço positivo através de uma memória que remete a sensação de prazer (OMS, 2006). O cigarro convencional também apresenta a nicotina como estimulante, entretanto, está relacionado diretamente à inúmeros casos de câncer devido a presença de mais de 2000 substâncias e impurezas já comprovadas pelo processo de combustão do cigarro convencional (DUTRA *et al.*, 2016).

Os flavorizantes ou *flavors*, são molécula de sabor com aromas que contribuem para as diferentes composições do e-líquido. De acordo com *Services USDoHaH. E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults* os flavorizantes apresentam-se em aproximadamente 7.700 diferentes tipos, permitindo combinações entre os sabores (*Services USDoHaH, 2016*) sendo a sua presença associada muitas vezes a atratividade do produto, assim como a efetividade sobre o mesmo sistema de recompensa que o cigarro convencional desencadeia (ZHU *et al.*, 2014). Essa ação similar sobre o sistema recompensa pode levar a troca do cigarro convencional pelo cigarro eletrônico (CZOLI *et al.*, 2016; TACKETT *et al.*, 2015). A característica de cada *flavor* direciona o tipo de consumidor, sendo os sabores que não remetem ao tabaco mais atraente aos jovens (CARPENTER *et al.*, 2005; LEWIS *et al.*, 2006). Os adultos possuem a preferência pelo sabor de tabaco, menta e frutados enquanto os jovens os doces que lembram sobremesa, como a baunilha. A adição dos sabores está relacionada a fase do gosto, na fixação do sistema recompensa. Associado a nicotina, o gosto pode intensificar o vício pelo sabor e assim, por consequência pelo cigarro (MOREAN *et al.*, 2018, HUANG, *et al.*, 2017). As diversas combinações possíveis, segundo a literatura, não apresentam estudos conclusivos com resultados sobre a toxicidade (SASSANO *et al.*, 2018, HUTZLER *et al.*, 2014), o que torna questionável a segurança do e-líquido assim como dos *flavors*, fato que estimula a Organização Mundial da Saúde (OMS) a não indicar a venda e distribuição do produto, devido à falta de

comprovação acerca de segurança. Em consonância com os órgãos regulamentadores internacionais, a ANVISA, desde 2009, por meio da RDC N° 46, de 28 de agosto, proíbe a venda, importações e propagandas de dispositivos eletrônicos com funcionalidade para fumar, principalmente para aqueles com o intuito de substituição dos produtos de tabaco convencionais, tais como: cigarro, cigarrilha, charuto e cachimbo.

Considerando que os flavorizantes podem ser substâncias de origem sintético ou não, utilizados no intuito de modificar, melhorar ou intensificar o aroma e sabor dos produtos de tabaco a partir 2012, foi estabelecida na RDC N° 14, de 15 de março, a proibição do uso de aditivo em produtos fumígenos, em que se inclui açúcares, adoçantes, vitaminas, ácidos graxos essenciais e minerais, aminoácidos, edulcorantes, aromatizantes, flavorizantes e melhorantes. A crescente adesão dos jovens aos novos produtos de tabaco está relacionada à presença de sabor nos cigarros, em que 60% dos usuários de cigarros eletrônicos o utilizam com flavorizante (AMBROSE *et al.* 2015; COREY *et al.* 2015). Estimativas indicaram que em 2013, era de aproximadamente 780.000 consumidores jovens, em sua maioria (SINGH *et al.* 2016; AMBROSE *et al.* 2015). E, apesar do crescente mercado consumidor, a segurança e os estudos toxicológicos não acompanharam o grande avanço da propaganda e consumo desse produto que, muitas vezes, é utilizado como substituinte do cigarro convencional de tabaco (HARTUNG, 2016). Por falta destes estudos sua venda não é proibida somente no Brasil, mas também em países como a Austrália e Canadá (WEEN, 2017).

1.2 O SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório é dividido em porção condutora e respiratória. Dentre as suas funções básicas está a troca gasosa e além do equilíbrio ácido-básico, fonação e metabolismo. A anatomia do sistema respiratório contribui com a fisiologia de cada parte do sistema. Assim, a presença de pelos, conchas nasais, dicotomia dos brônquios auxiliam na filtração do ar e aquecimento e nas trocas gasosas (SILVA, 2010, p730).

A porção condutora alcança desde as fossas nasais até os bronquíolos e a porção respiratória é composta dos bronquíolos até os alvéolos. A função básica da porção inicial do sistema respiratório, está na entrada e saída dos gases, filtração, umedecimento e aquecimento do ar. Tudo isso devido a combinação de tecido cartilaginoso, conjuntivo, muscular liso e o epitélio respiratório especializado (JUNQUEIRA, 2002, p337). O epitélio predominante na

porção condutora desse sistema é ciliado pseudo-estratificado, com glândulas subepiteliais secretoras de muco (SILVA, 2010 p730).

Como ponto final da porção respiratória, os alvéolos são responsáveis por realizar as trocas gasosas devido à fina parede aglomeradas em conjuntos parecendo colmeias, com aberturas laterais e uma delgada camada de epitélio apoiada em tecido conjuntivo ligado aos capilares sanguíneos. O septo alveolar ou parede interalveolar é formado principalmente por células endoteliais dos capilares e pneumócitos tipo I e tipo II. Sendo assim, o ar alveolar é separado da rede de capilar pelo citoplasma dos pneumócitos, citoplasma endotelial e a sua lâmina basal. Os pneumócitos do tipo I, ou células pavimentosas, possuem morfologia bastante delgada com núcleo achatado, presença de desmossomos e zônulas de oclusão, também chamadas de junções oclusivas com a função de barreira para a passagem de líquidos e permitindo a passagem de gases. Os pneumócitos tipo II, ou células septais, estão entre os pneumócitos tipo I, formando junções unitivas e desmossomos, apresentando morfologia arredondada com núcleo grande e vesicular além de apresentar o citoplasma vacuolizado. A vacuolização do citoplasma dessas células é devido aos corpos multilamelares que contêm fosfolipídios, principalmente dipalmitoilfosfatidilcolina e fosfatidilglicerol, proteínas, glicosaminoglicanos e os íons cálcio. Esses produtos lamelares dão origem a camada surfactante. (JUNQUEIRA, 2002, p337, SILVA, 2010 p730-733).

A camada surfactante possui a função de reduzir a tensão superficial dos alvéolos, mantendo a força de inspiração mínima, assim como, a manutenção da funcionalidade dos alvéolos evitando o colapamento de suas paredes. Os próprios pneumócitos I e II fazem a renovação do material surfactante assim como os macrófagos alveolares. Essa camada surfactante ao ser removida e transportada pelos movimentos ciliares e se mistura ao líquido broncoalveolar, o que ajuda na renovação do epitélio (GUYTON, 2011, p92, JUNQUEIRA, 2002, p348).

Dentro da divisão dos alvéolos, além do epitélio com pneumócitos, existe a parte de poros alveolares e a presença de macrófagos. Os macrófagos também podem ser chamados de células de poeira e se distribuem nos septos alveolares e na superfície dos alvéolos. Essas células possuem a função de limpeza, principalmente aquelas que se distribuem na camada surfactante e produzem substâncias broncoconstritores, tais como a histamina (GUYTON, 2011, p497). Substâncias como poeira, dióxido de enxofre e agentes de poluição atuam diretamente no tecido pulmonar causando ações sobre as vias aéreas (JUNQUEIRA, 2002, p349).

1.3 DOENÇAS RELACIONADAS AO SISTEMA RESPIRATÓRIO

As substâncias, de forma geral, dependendo das suas características físicas, químicas e biológica são consideradas agentes tóxicos. A relação entre a concentração de uma agente químico e o seu tempo de interação com o organismo resulta em exposição que por sua vez pode ter características tóxicas ou não. Sendo assim a toxicidade de uma substância está diretamente ligada ao resultado de dano ou morte celular, tecidual ou do organismo (OLGA, 2014). O sistema respiratório é uma das vias de entrada de substâncias ao sistema total, devido a sua alta capacidade de distribuição, (CLIPPINGER, *et al.*, 2018). A característica das partículas pode promover diferentes ações de danos em diferentes tecidos. Ao sistema respiratório em sua camada superior do sistema, temos algumas ulcerações e as perfurações do septo nasal, lesões da cavidade oral, rinosinusopatias alérgicas ou irritativas, rinitíase, disfonias, laringites, traqueítes e as neoplasias (BAGATIN 2006, DIAS *et al.*, 1995).

As doenças relacionadas às exposições de toxicantes geram um grande número de admissões hospitalares como crises asmáticas resultado de inflamações pulmonares, problemas neurológicos além de encefalopatia por inalação de substâncias tóxicas com distribuição sistêmica (TISSERAND; SYDBOM *et al.*, 2001). De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em nota informativa de 2018, as doenças pulmonares estavam entre as 10 principais causas de morte no mundo sendo, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em terceiro lugar, infecções das vias respiratórias inferiores em quarto lugar, câncer de pulmão, traqueia e brônquios em sexto e tuberculose em décimo. A análise realizada pelo boletim traz a comparação entre os anos de 2000 e 2016, conferindo a informação de que as infecções das vias respiratórias inferiores são as mais transmissíveis e letais.

Ademais, estima-se que cerca de 80% dos casos de câncer de pulmão são consequências da inalação de tabaco e as substâncias associadas (NORDGREN TM & BAILEY, 2016; LATIMER, 2018; SYDBOM *et al.*, 2001). Em uma estimativa, os cigarros, de forma geral, teriam, em 2020, aproximadamente 7,5 milhões de usuários, sendo o causador de 71% das mortes por câncer de pulmão, 42% de doenças crônicas respiratórias e 10% de doenças cardiovasculares (LINE *et al.*, 2007). Dados dispostos pelo grupo de Hodge *et al.* 2007, mostrou que a ação de extrato de fumaça de cigarro e doenças como DPOC diminuem consideravelmente a funcionalidade celular dos macrófagos assim como o extrato da fumaça de e-líquido, como o que foi descrito por Ween, *et al.*, 2017, permitindo que microrganismos como os responsáveis por doenças como a pneumonia e influenza, permaneçam ativos no

sistema respiratório e assim ter a instalação do quadro da doença (SUSSAN *et al.*, 2015, WEEN, *et al.*, 2017). Outro dado disponível na literatura, sugere que o cigarro eletrônico pode influenciar na expressão de citocinas inflamatórias, aumentando ou diminuindo a sua produção (WEEN, *et al.*, 2017).

1.3.1 EVALI ou lesão pulmonar associada ao uso de cigarro eletrônico

Em 2019, houve relatos do que ficou conhecido por *EVALI (e-cigarette use-associated lung injury)* em jovens em média de 35 anos. A doença apresentou-se em diferentes sintomas visto que os pacientes manifestaram complicações respiratórias, gastrointestinais e cardíacas, sendo necessário a junção de fatos para o diagnóstico da doença (MATTHAY, *et al.*, 2019). Alguns relatos indicam a presença de THC (tetrahydrocannabinol), MCT, VEA, entre outras substâncias. Inicialmente, os danos pulmonares, pneumonia lipóide, pneumonia eosinofílica e o alto perfil inflamatório foram atribuídos a presença de VEA e THC. Estudos complementares, entretanto, comprovaram a presença de outras substâncias potencialmente tóxicas ao sistema respiratório em e-líquidos, sejam eles falsificados ou com grau de produção (HARTNETT, *et al.*, 2019, HENRY, 2019, LU, 2020; MATTA, *et al.*, 2020).

A partir de agosto de 2019, o CDC (*Centers for diseases Control and Prevention*) órgão responsável pelo monitoramento de doenças dos Estados Unidos da América, determinou certas recomendações acerca dos cuidados necessários aos pacientes portadores dessa nova doença, seguindo o critério de uma avaliação clínica inicial, admissão e tratamento no hospital, acompanhamento, considerações a grupos de risco e ação clínica e ao público, descrito no *Severe pulmonary disease associated with using e-cigarette products*. Em atenção, o CDC ainda recomenda que produtos derivados do tabaco, como os cigarros eletrônico, não devem ser utilizados por jovens, adultos ou mulheres grávidas. Até outubro do mesmo ano, no distrito de Columbia, E.U.A, foram reportados 1.299 casos de EVALI, em que 70% eram homens com média de 24 anos, 80% menores de 35 anos e 15% menores de 18 anos, segundo a publicação *Update: Interim Guidance for Health Care Providers Evaluating and Caring for Patients with Suspected E-cigarette, or Vaping, Product Use Associated Lung Injury*.

Em um relato de caso, disposto pelo grupo de Mukhopadhyay, 2020 e colaboradores, nos oito casos avaliados, houve dano pulmonar, sendo observados pela pneumonia, dano alveolar difuso, dano na organização pulmonar e a combinação de todos os eventos. De maneira

específica, nos casos de danos alveolar difuso na fase aguda, observou-se a formação de uma membrana hialina e a expansão do septo alveolar por meio dos fibroblastos. Também foi observado um exsudato fibrinoso em diferentes fases de organização na interface externa dos alvéolos e o perfil de inflamação crônica intersticial com linfócitos. Os macrófagos encontrados no espaço alveolar, não era a maioria, sendo os CD68 os de maior número. O citoplasma dessas células estava com característica espumosa, vacuolado, o que é uma particularidade da pneumonia lipóide. Depósitos lipídicos também foram encontrados e envoltos por células gigantes e multinucleadas. Sendo todos estes danos associados ao uso de cigarros eletrônicos.

1.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PARA O SISTEMA RESPIRATÓRIO

A avaliação da toxicidade para a via respiratória a testes de toxicidade aguda, que, de acordo com a Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Co-operation and Development – OECD*), são os efeitos gerados pela substância exposta pelo período entre 4 a 6 horas principalmente (OECD, 2009c). Essa técnica de avaliação utiliza o corpo ou apenas o nariz de roedores exposto à substância (PRYTHERCH, & BÉRUBÉ, 2014a; PARENT, 2015). A partir de 2005, medidas que buscam reduzir o número de animais na pesquisa em testes de toxicidade aguda vem sendo tomadas, buscando métodos alternativos para fins regulatórios (HAMM *et al*, 2017; CLIPPINGER *et al*, 2018a).

A necessidade de novos métodos é baseada nas inúmeras diferenças observadas entre o sistema humano e de roedores podendo ser evidenciadas as fisiológicas, anatômicas, forma de ventilação, metabolismo, composição dentro do trato respiratório. Assim, os esforços da comunidade científica estão voltados para desenvolver métodos que predigam a resposta real humana frente às diferentes substâncias investindo em pesquisas *in silico* e *in vitro* (CLIPPINGER, 2018) assim como avaliar as diferentes vias de possíveis efeitos adversos (da sigla em inglês *AOP- Adverse Outcome Pathway*). A complexidade celular observada no sistema respiratório humano exige sistemas experimentais que se aproximem similarmente desse ambiente, assim como a interface ar-líquido (CLIPPINGER *et al.*, 2018a). Modelos que utilizam a cocultura celular, como células primárias com diferenciação, já foram comercialmente desenvolvidos. A exemplo tem-se: MucilAir™ ou SmallAir™ (Epithelix), EpiAirway™ (MatTek Corporation), estes representam tecido nasal, traqueal e brônquico saudáveis ou com patologias, como asma, rinite e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

(TOLLSTADIUS, 2019a). A utilização de linhagens de origem pulmonar humana como A549, BEAS-2B e CALU-3 permitem um refinamento e similaridade aos testes toxicológicos (GIARD *et al.*, 1973).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de e-líquidos e seus constituintes sobre a linhagem pulmonar A549, utilizando monocamada e o modelo alveolar 3D com arquitetura tecidual mais mimética ao tecido respiratório humano associados à exposição apical e em interface ar-líquido utilizando a câmara Vitrocell®. Considerando a nova forma de exposição das substâncias-teste e o modelo padronizado que utiliza a linhagem A549, foram propostas diferentes formas para as avaliações dos resultados a exposição do e-líquido e seus componentes de forma isolada.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar e determinar a citotoxicidade, pela redução do reagente de MTT, de refis de cigarro eletrônico, e-líquido, de diferentes marcas e sabores em monocamada de células A549 submersa em meio de cultura específico;
- Avaliar e determinar a citotoxicidade de flavorizante, a ser escolhido de acordo com a literatura, em monocamada de células A549 submersa em meio de cultura específico;
- Reproduzir o modelo alveolar 3D, com células da linhagem A549, cultivadas em interface ar-líquido;
- Avaliar pela redução do reagente de MTT, no modelo alveolar 3D reproduzido, o e-líquido (produto final) e seus constituintes, com exposição pela câmara de nebulização Vitrocell®;
- Avaliar histologicamente os danos que poderiam ser causados frente à exposição das substâncias-teste.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem escolhida, A549, proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram mantidas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² na densidade de 5x10⁵ células/cm² em meio HAM-F12 (Sigma-Aldrich™) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma-Aldrich™) e 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco™) cultivadas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Para a desagregação química enzimática utilizou-se tripsina/EDTA (0,25%/0,03%) (Sigma-Aldrich™). A manutenção da linhagem era realizada com o intervalo de um dia obedecendo à confluência de 90%. Para a contagem das células e o monitoramento da viabilidade celular, foi utilizado o contador automático de células TC20 (BioRad™) de acordo com protocolo do fabricante. Valores de viabilidade acima de 90% foram considerados satisfatórios para a realização dos ensaios subsequentes.

3.2 PREPARO DAS SUBSTÂNCIA-TESTE

As amostras escolhidas para os testes foram: e-líquido completo de baunilha e e-líquido completo de menta, ambos com e sem nicotina, essência de baunilha, mistura de propilenoglicol 70% (Qhemis, Indaiatuba-SP) e glicerina 30% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.2.1 E-líquido completo

Os refis de cigarro eletrônico, e-líquido, foram adquiridos em uma tabacaria regional na cidade de Goiânia-GO. As amostras des e-líquido foram preparadas imediatamente antes das exposições.

3.2.1.1 E-líquido de menta

O refil de sabor menta foi utilizado em 3 concentrações diferentes de nicotina, (0mg, 3mg e 5mg) de mesma marca. As soluções foram preparadas solubilizando a substância teste em meio de cultura HAM-F12, em uma concentração final da solução de 50%, para posterior diluição seriada, para os testes em monocamada, chegando as concentrações do e-líquido com 0 mg e 3 mg de nicotina (0,03; 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5%) e de 5 mg de nicotina (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3%). Para os testes no modelo alveolar 3D utilizou-se o e-líquido de 5 mg de nicotina na concentração de 35% e 25%.

3.2.1.2 E-líquido de baunilha

O refil de sabor baunilha, foi utilizado em 2 concentrações diferentes de nicotina, (0 mg, 3 mg), a concentração de 5 mg não foi encontrada na tabacaria local. As soluções foram preparadas solubilizando a substância teste em meio de cultura HAM-F12, em uma concentração final da solução de 50%, para posterior diluição seriada, para os testes em monocamada, chegando as concentrações do e-líquido com 0 mg e 3 mg de nicotina (0,03; 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5%).

3.2.2 Essência de baunilha

A essência de baunilha foi escolhida a partir do levantamento bibliográfico que indicou que o *flavor* de baunilha apresentava toxicidade superior. Sendo assim, a referida essência foi adquirida em forma de pó e as soluções para teste foram feitas com a solubilização do pó em PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) na concentração de 100 mg/mL com posterior diluição seriada (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156; 0,078 mg) para os testes em monocamada e 50 mg/mL para os testes no modelo alveolar 3D.

3.2.3 Veículo Propilenoglicol e glicerol

A mistura de propilenoglicol 70% (Qhemis, Indaiatuba-SP) e glicerina 30% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi preparada inicialmente com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) formando uma solução iônica, para que concentrações de 35% e 25% pudessem ser nebulizadas.

3.3 AVALIAÇÃO DE CITOTOXIDADE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS A549

3.3.1 Método de redução do sal de tetrazólio (MTT)

Utilizando o ensaio de redução do sal brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) adaptado de Mosmam (1983) avaliou-se a citotoxicidade das substâncias testes em células A549 em monocamada. Para isso, duas placas de 96 poços de fundo chato com 5×10^3 células por poço foram usadas como experimentos independentes. Após 24 horas, foram adicionados 100 μ L das concentrações estabelecidas das substâncias testes. O período determinado para as exposições foi de 24 horas com as placas mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37°C. Decorrido o tempo de exposição estabelecido, a substância foi

descartada e a placa incubada com 10 µL da solução de MTT na concentração de 5 mg/mL durante 3 horas. Os sais formados foram solubilizados em 100 µL de DMSO e a leitura dos experimentos foram realizados em espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan®) a 570 nm. Os valores da média de absorbância de cada concentração foram convertidos em viabilidade celular considerando o controle como referência.

3.4 CONSTRUÇÃO DO MODELO 3D DE EPITÉLIO ALVEOLAR

Utilizando-se de insertos com poros de 0,4µm de diâmetro (Falcon, Tewksbury, MA, EUA), reproduziu-se o desenvolvimento do epitélio alveolar 3D com células da linhagem A549. Adicionou-se aos insertos uma matriz de colágeno tipo I (BD Biosciences, NJ, EUA). Os insertos com a matriz de colágeno foram dispostos em uma placa de 20 poços, que continham meio basal HAM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina. Em seguida, as células A549 foram transferidas para o inserto na quantidade de 5×10^5 células/inserto. As placas foram mantidas em estufas de cultivo celular em condições controladas de 37 °C e atmosfera úmida de 5% de CO₂. Decorrido o tempo pré-determinado de 5 horas para a sedimentação e adesão celular, o meio apical do inserto foi retirado. A partir de dados da literatura essa reprodução de modelo mantém seu desempenho satisfatório por até quatro dias. Considerou-se dia zero como o dia da preparação do modelo e o dia dois como o dia para a exposição, sendo as leituras dos testes subsequentes no terceiro dia, garantindo a reprodução do modelo conforme metodologia escolhida (TOLLSTADIUS *et al.*, 2019).

3.5 EXPOSIÇÃO DOS MODELOS 3D A AEROSSÓIS

Para a exposição dos insertos foi utilizado o equipamento Vitrocell® Cloud, que promove a nebulização do líquido desejado. Assim, seguindo o protocolo operacional padrão do equipamento, em fluxo laminar, o módulo-base foi ligado para aquecimento até temperatura de 37°C, anteriormente ajustada. O aparelho, base e topo expositor, foram limpos com álcool

70% [v/v], o nebulizador deixado em álcool 70% [v/v] por 15 minutos e, em seguida, deixado para secar em temperatura ambiente. Com os insertos colocados no módulo-base, foram nebulizados 200 µL das soluções de e-líquido e mistura correspondentes (veículos e *flavor*). A frequência de nebulizações foi estabelecida de acordo com o fator de deposição da câmara

3.6 AVALIAÇÃO DO MODELO ALVEOLAR EPITELIAL 3D APÓS A EXPOSIÇÃO DA SUBSTÂNCIA-TESTE

3.6.1 Avaliação da viabilidade pela redução do sal de tetrazólio – MTT

Para a avaliação da viabilidade dos insertos utilizou-se a redução do sal de tetrazólio (MTT). Após o tempo adequado de exposição anteriormente determinado, retirou-se o meio basal de cada inserto. Colocou-se em cada poço, 600 µL uma solução de meio HAM F12 com o MTT à 0,5 mg/mL e incubados por 3 horas em condições controladas de 37 °C e atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em microtubos, com 1 mL de isopropanol, (Dinâmica[®], Química contemporânea Ltda, SC, BR) os tecidos retirados dos insertos foram colocados sob agitação de 30 RPM por 3 horas protegidos da luz. Alíquotas de 200 µL foram transferidas, em triplicata, para uma placa de 96 poços de fundo arredondado para leitura em espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific Multiskan[®] Spectrum, Boston, MA, USA) a 570 nm.

3.6.2 Análise morfológica

Os modelos reconstruídos 3D foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4), desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast (Leica Microsystems, Bannockburn, EUA). Os tecidos incluídos foram cortados em espessura de 5µm tranferidos para lâminas de microscopia e corados com Hematoxilina/Eosina. A avaliação foi realizada em microscópio óptico (DM 2000, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por meio dos valores de média e desvio padrão dos diferentes experimentos. Para os ensaios de citotoxicidade em monocamada, a CI_{50} foi obtida por regressão não linear, com transformação dos valores da concentração para logarítimo para estimativa de em dose-resposta. Os resultados de viabilidade para o modelo alveolar 3D foram comparados em grupos de controle e tratado. Todas as análises utilizaram o software Graphpad Prism 8.0.

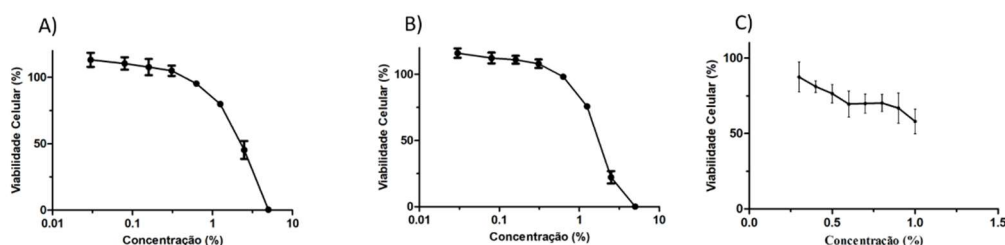
4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PELA REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO – MTT

4.1.1 Monocamada de células A-549 frente à exposição de e-líquido sabor menta e baunilha

A citotoxicidade foi determinada pelo método de redução do MTT após a exposição por 24 horas das células ao e-líquido sabor menta. Foram determinadas oito concentrações para as exposições sendo que para o e-líquido de concentrações 0 mg e 3 mg de nicotina 0,03; 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5%, para o de concentração 5 mg de nicotina, 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3%. Em todas as condições testadas constatou-se a diminuição atividade celular em concentração-dependente, conforme Figura 1. A partir dos dados obtidos, as CI_{50} para os e-líquidos sem nicotina, 3 mg de nicotina e 5 mg de nicotina foram, respectivamente, 2,482%, 2,046% e 0,55%.

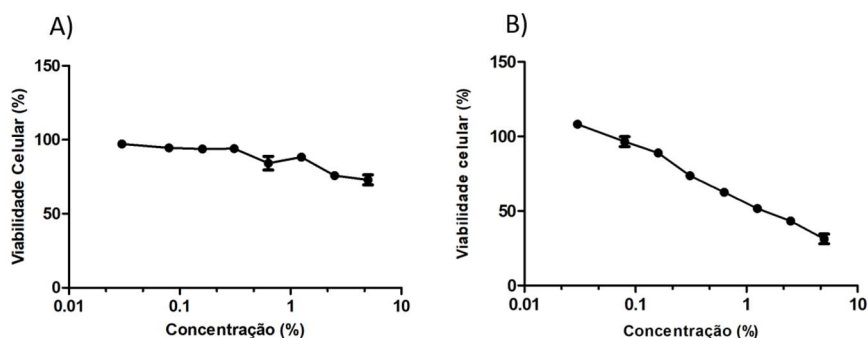
Figura 1: Efeito citotóxico obtidos por MTT, após o tratamento das células em monocamada, com e-líquido sabor menta por 24 horas. A) concentração de 0 mg de nicotina B) concentração de 3 mg de nicotina e C) concentração 5 mg de nicotina



Seguiu-se o mesmo protocolo de exposição para o e-líquido sabor baunilha, sendo assim foram determinadas oito concentrações utilizadas nas exposições sendo para o e-líquido com concentração de 0 mg e 3 mg de nicotina 0,03; 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5%, em que se constatou a atividade celular concentração-dependente, conforme Figura 2. Sendo assim,

como CI_{50} dessas substâncias, pode-se estimar as concentrações de 0,4160% para concentração de 3 mg de nicotina e para concentração de 0 mg de nicotina o CI_{50} foi maior que intervalo de concentrações testadas.

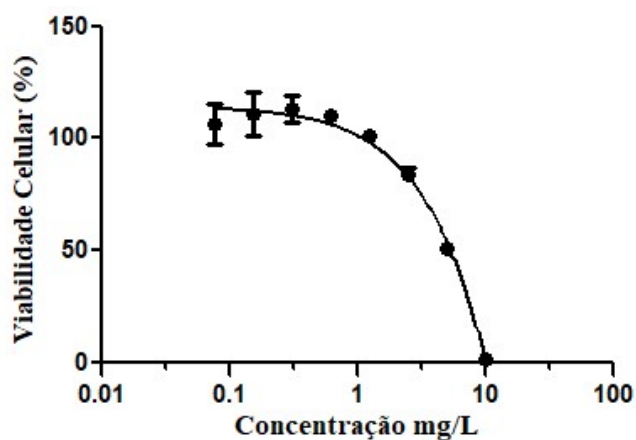
Figura 2: Efeito citotóxico obtidos por MTT, após o tratamento das células em monocamada, com e-líquido sabor baunilha por 24 horas. A) concentração de 0 mg de nicotina B) concentração de 3 mg de nicotina



4.1.2 Monocamada de células A-549 frente a exposição a essência de baunilha

O comportamento da linhagem A549 disposta em monocamada após da exposição, por 24 horas, pela essência de baunilha as oito concentrações definidas 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156; 0,078 mg, avaliada pelo ensaio de redução do MTT, apresentou atividade citotóxica concentração-dependente, conforme demonstrado na Figura 3, estimando-se a concentração de 5 mg/ mL de essência de baunilha como CI_{50} .

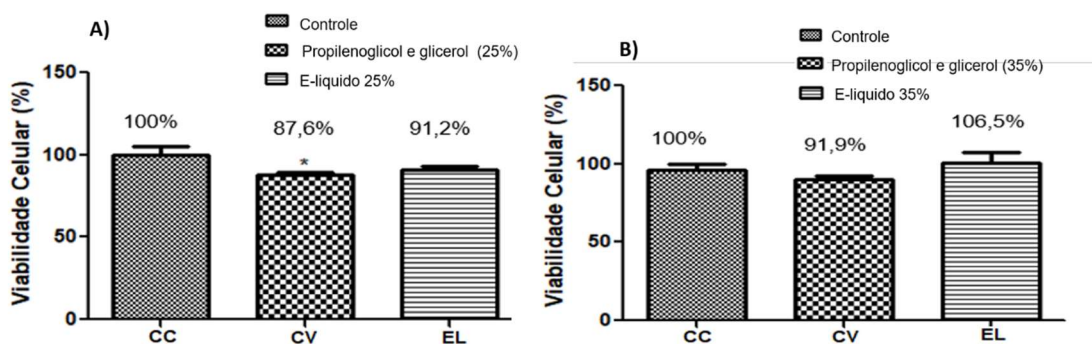
Figura 3: Efeitos citotóxico avaliado por redução do MTT após exposição de essência de baunilha por 24 horas das células em monocamada de A549



4.1.3 Modelo alveolar epitelial 3D frente à exposição do e-líquido e mistura de propilenoglicol e glicerol

Definiu-se a concentração de 25% e 35%, com o intuito de obter a concentração de 0,06% e 0,168% no poço após a nebulização. A viabilidade celular observada em ambos os experimentos, mostram-se, de acordo com a Figura 4, serem valores consideravelmente inalteradas. A viabilidade celular, para as substâncias testes de propilenoglicol e glicerol (CV) e e-líquido (EL) respectivamente de: 87,6% e 91,2% para a concentração de 25% e 91,6% e 106,5% para a concentração de 35%. O tempo de deposição da nuvem também foi uma das variáveis de relevância para o estudo das substâncias. Sendo 20 minutos o tempo necessário para que toda a nuvem de propilenoglicol e e-líquido na concentração de 25% fossem depositadas na base, enquanto para a concentração de 35% o tempo de deposição de toda a nuvem foi de 2 horas.

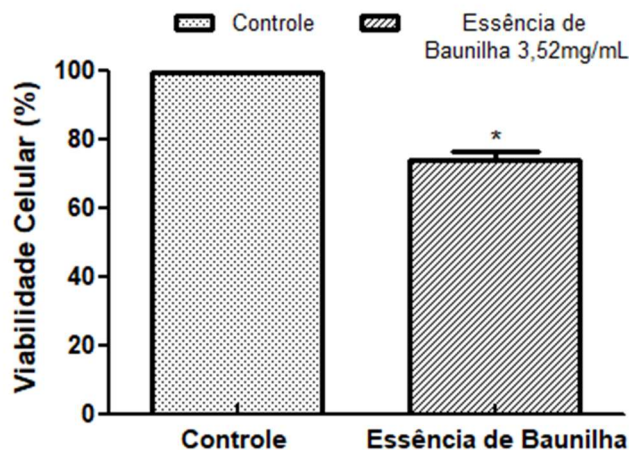
Figura 4: Viabilidade do modelo alveolar 3D frente a exposição pela Vitrocell® Cloud da solução de propilenoglicol e glicerol (CV) e e-líquido (EL). (A) concentração de 25% e (B) concentração de 35%.



4.1.4 Modelo alveolar epitelial 3D frente a exposição da essência de baunilha

Observou-se o comportamento do modelo alveolar avaliados pela redução do MTT após a exposição da essência de baunilha, a solução de 50 mg/mL, por 24 horas. Considerando-se o grau de eficiência da máquina de 80%, tem-se em cada poço a concentração de 8,8%. Assim, para a solução de 50 mg/ml nebulizada 2 vezes tem-se a concentração de 3,52 mg de essência de baunilha. A partir dessa concentração, notou-se a viabilidade celular reduzida aproximadamente em 30% conforme visualizado na Figura 5.

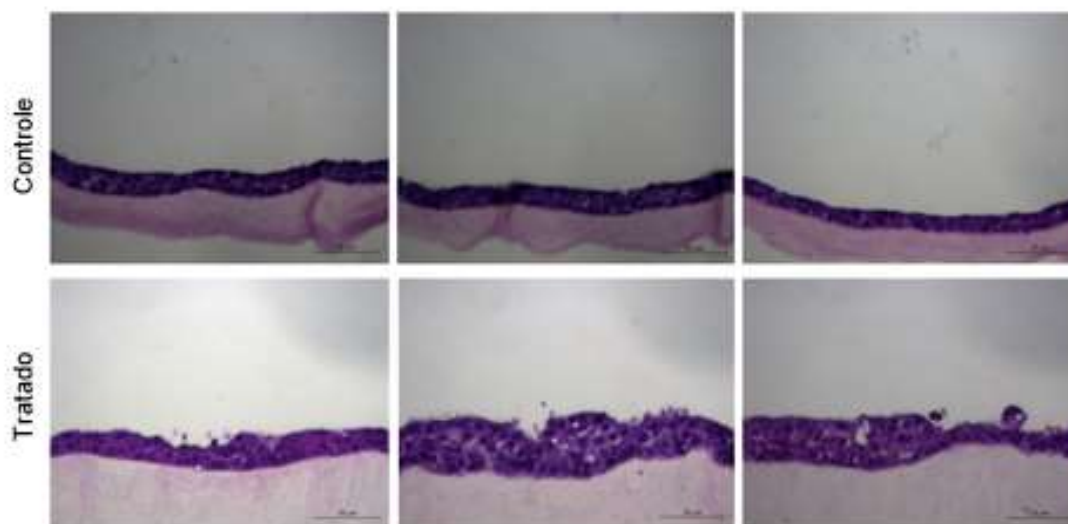
Figura 5: Viabilidade do modelo alveolar 3D frente a exposição da essência de baunilha pela câmara Vitrocell® Cloud



4.1.5 Avaliação morfológica por histologia com coloração em HE após a exposição do modelo alveolar epitelial 3D à essência de baunilha

De acordo com a viabilidade celular encontrada após as diferentes exposições das substâncias-teste, aquela que apresentou valor considerável de alteração foi a essência de baunilha. Para a histologia observou-se algumas diferenças entre o controle e o tratado. O controle apresentou uma camada mais simples e uniforme, diferentemente do tratado com essência de baunilha a concentração de 3,52 mg/mL, que exprimiu uma inconstância tecidual, maior número de camadas celulares e descamação da camada mais externa, efeitos que podem ser observados na Figura 6 a seguir.

Figura 6: Fotomicrografias do modelo alveolar epitelial 3D, após a exposição de 24 horas dos tecidos a essência de baunilha. Imagens obtidas após coloração dos cortes por Hematoxilina-eosina, sendo adquiridos em microscópio óptico em objetiva de 40x.



5 DISCUSSÃO

O produto e-líquido, foi escolhido para a realização de testes toxicológicos com a observação dos seus efeitos em células pulmonares alveolares do tipo pneumócitos II em diferentes organizações celulares: monocamada e em estrutura 3D. O produto apresentou em seu rótulo a estimativa das concentrações de seus constituintes que são: 70% propilenoglicol, 30% glicerina, nicotina e flavorizantes. A priori, estabeleceu-se o uso do e-líquido de sabor menta em três concentrações de nicotina, sendo elas: 0 mg, 3 mg, 5 mg. Pelo método de redução do MTT em monocamada submersa e, para este estudo, identificou-se a CI_{50} de 2,482%; 2,046%; 0,55%, respectivamente. Devido a gama de flavorizantes disponíveis, pelas diversas combinações existentes e pelas marcas com diferentes níveis de qualidades de produção, um e-líquido de sabor diferente foi avaliado com a hipótese que diferentes *flavors* e a falta de procedimentos padronizados pudessem causar algum tipo de dano ou morte celular. O sabor baunilha foi escolhido devido a sua toxicidade já relatada na literatura. O e-líquido de baunilha, produto final, foi testado em duas concentrações de nicotina, sendo elas de 3 mg e 0 mg disponíveis no mercado regional de Goiânia. Os valores de CI_{50} foram: 0,4160% para a concentração de 3 mg de nicotina e para a concentração de 0 mg de nicotina o CI_{50} estava fora da faixa de concentração avaliada no experimento de MTT.

Os resultados de CI_{50} encontrados para os e-líquidos de menta e baunilha, em concentrações de nicotina variáveis, mostraram-se diferentes quando comparados entre si. Avaliados em mesmas condições experimentais, os produtos apresentaram resultados toxicológicos diferentes, o que pode ser justificado pela dificuldade em padronização da composição química dos componentes do produto final, pelas diferentes marcas avaliadas, assim como a presença de diferentes flavorizantes (CERVELLATI, 2014). De acordo com estudos do grupo de Bahl *et al*, 2012 e Cevellati, 2014, a citotoxicidade do produto final e-líquido, não está relacionada diretamente a presença ou ausência de nicotina, assim como a seus componentes propilenoglicol e glicerol. Sendo assim, a concentração de *flavor* na mistura final seria a possível causadora dos danos celulares. Com todos os eventos, pode-se supor que a ação tóxica do e-líquido encontrada em monocamada poderia ser resultado dos componentes flavorizantes. De acordo com Sassano *et al*, 2018 a concentração de flavorizantes como constituintes de e-líquidos possui variação de 0,01% a 8% e, dentre a gama de flavorizantes produzidos e utilizados atualmente, o de baunilha foi o que apresentou maior toxicidade. A monocamada de A549 submersa indicou CI_{50} de 5 mg/mL para a exposição do flavorizante de baunilha. Entretanto as avaliações realizadas não representavam de forma ideal a exposição das

células pulmonares ao produto final, e-líquido. Os *flavors* de forma geral, são considerados seguros para o consumo oral, entretanto a toxicidade para a inalação não foi testada, sendo algumas dessas substâncias potencialmente tóxicas (BEHAR, *et al.*, 2016).

O modelo 3D, com linhagem A549 e a interface ar-líquido, previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa, permite novas condições para a exposição de um mesmo produto. De acordo com Tollstadius *et al.*, 2019 o modelo torna mais mimético a forma de exposição do produto em células alveolares, podendo ser considerada uma forma mais adequada para avaliação de substâncias no trato respiratório. A inovação quanto a forma de exposição das substâncias-teste e o modelo alveolar epitelial 3D escolhido permitem a reflexão de como as diferentes formas de apresentação de uma substância-teste influencia o comportamento celular, assim como para o trabalho desenvolvido por Tollstadius *et al.*, 2019 que utilizou o mesmo sistema de nebulização de substâncias.

Uma segunda hipótese testada foi a influência do veículo no comportamento tóxico apresentado pelo e-líquido completo. Para isso, foram definidas duas concentrações de 25% e 35% para duas substâncias teste, o e-líquido (produto comercial) e o veículo (propilenoglicol 70% e glicerina 30%) conforme descrito nos rótulos dos e-líquidos. O sistema de exposição usado que mimetiza uma exposição inalatória criando uma interface ar-líquido torna relevante o resultado encontrado para a viabilidade celular do modelo alveolar epitelial 3D que foi de aproximadamente 90% para ambas as substâncias-testes.

A partir desses resultados, pode-se inferir que a presença do veículo composto de propilenoglicol e glicerina não interfere na viabilidade celular, pelo parâmetro de morte celular avaliado. Esse achado se assemelha ou descrito por Sassano *et al.* (2018), que afirma que a concentração próxima a 1% de propilenoglicol e glicerina não induz a morte celular. Entretanto a diferença entre o tempo de deposição da nuvem entre o controle, PBS, e as substâncias-teste, inviabiliza esse modelo como ideal de exposição pois não considera as mesmas condições experimentais.

O e-líquido, por sua vez apresentou-se quase inerte frente a forma de exposição e a sua ação celular, mesmo com diferentes condições, diferentemente do que foi encontrado em experimentos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa e descrito por Sassano *et al.* (2018). A ação tóxica do e-líquido encontrada em monocamada previamente poderia ser resultado dos flavorizantes, visto que, a monocamada de A549 indicou uma CI_{50} de 5 mg/mL enquanto que para a exposição por Vitrocell[®] Cloud 12 systems ao modelo alveolar epitelial 3D obteve-se uma redução da viabilidade em 30% para a concentração de 3,52 mg/mL da essência de baunilha.

A diferença encontrada entre os valores pode ser explicada pelos diferentes métodos exposição e o formato tecidual. As limitações descritas em literatura afirmam que há interferência do meio de cultura no fenótipo celular, sedimentação e interação das partículas e sua difusão, sendo o modelo tridimensional complexo de camadas com a interface ar-líquido aquele que mimetiza em parte o sistema respiratório (AUFDERHEIDE, 2005; RACH *et al.*, 2014; CLIPPINGER *et al.*, 2018a). A forma de exposição com a formação de aerossóis pelo sistema Vitrocell® Cloud 12 system aproxima-se do modelo de exposição inalatória, de substâncias que podem formar aerossóis e se depositam de maneira similar em todas as partes na interface ar-líquido (WEBER *et al.*, 2013).

No estudo proposto, na concentração de 3,52 mg/mL de essência de baunilha observa-se diferenças consideráveis entre o controle e o tratado que expressou uma inconstância tecidual, maior número de camada celular e descamação da camada mais externa. A complexidade de um tecido envolve a sua organização e a relação entre as células vizinhas além da presença de junções intercelulares que garantem a unidade do tecido (TSUKITA, 2019). Em estudos desenvolvidos pelo grupo de Tatsuta, *et al.*, 2019, observou que após a exposição ao extrato da fumaça de cigarro eletrônico houve uma ruptura entre alguns tipos de junções intercelulares e o aumento da permeabilidade do tecido epitelial a outras camadas, tendo assim uma inconstância no modelo brônquico com interface ar-líquido, o que justificaria a inconstância tecidual apresentada nos resultados deste trabalho.

Considerando os resultados encontrados tanto pelo grupo quanto o disposto na literatura, pode-se inferir que, os estudos que comprovam a segurança do e-líquido ainda devem ser melhorados. A presença câmara Vitrocell® Cloud 12 system e do modelo 3D apesar de inovadores, ainda não contemplam todos os parâmetros influenciadores da exposição de e-líquidos em condições normais. Isso visto que o aquecimento pela bateria do dispositivo não é alcançado pelos métodos aqui aplicados. As diferentes viabilidades celulares encontradas na exposição em monocamada submersa e no modelo alveolar epitelial 3D, indicam que a complexidade do modelo reflete uma considerável influência sobre a avaliação da ação citotóxica de substâncias possivelmente inaladas. Assim como a dificuldade em padronização do produto através de suas diferentes marcas e *flavors* utilizados.

O estudo está em concordância com o cenário que envolve a necessidade de cuidado com o consumo desse substituinte ao tabaco convencional que, de acordo com a ANVISA, é um produto ilegal (SINGH *et al.* 2016; AMBROSE *et al.* 2015) assim como o aprimoramento de técnicas voltados a avaliação pulmonar. Como o que foi concluído pelo estudo de Traboulsi e colaboradores de fevereiro de 2020, atualmente não se consegue afirmar se o uso de cigarros

eletrônicos causa declínio da função pulmonar, se a fumaça é tão prejudicial quando a o cigarro convencional, qual o grupo de risco, sendo necessário a construção de conhecimento sólido sobre o produto e sua ação, para que se possa chegar a uma conclusão.

6 CONCLUSÃO

Os testes realizados neste trabalho permitiram uma visão ampla quanto ao potencial citotóxico do e-líquido e seus constituintes. Assim como as diferentes formas de exposição do produto e modelos de avaliação, a avaliação celular permitiu reavaliar a coerência entre a correlação das formas de exposição para cada substância. Sendo possível concluir que:

- A diferentes marcas e-líquidos, sabores de *flavor* e a falta de padronização do produto de podem interferir nos resultados frente a exposição celular.
- Para a avaliação da citotoxicidade por MTT em monocamada de produtos comerciais de e-líquido nos sabores menta e baunilha obteve-se resultados diferentes. Para o sabor de menta nas concentrações de 0 mg, 3 mg e 5 mg de nicotina as concentrações de CI_{50} foram: 2,482%, 2,046% e 0,55%. Por sua vez, para o e-líquido de sabor baunilha para concentração de 3mg de nicotina estimou-se a concentração de 0,4160%, enquanto que para concentração de 0 mg de nicotina não foi possível obter a estimativa pois o CI_{50} estava fora do intervalo de concentrações testadas.
- Estabeleceu-se a concentração de 5 mg/mL como CI_{50} para a citotoxicidade por MTT para o *flavor* de baunilha, a partir dos resultados encontrados em monocamada.
- Para as substâncias indicadas como veículos (propilenoglicol e glicerol), a viabilidade celular avaliada por MTT através das exposições pela câmara Vitrocell® Cloud 12 system no modelo alveolar 3D, foi aproximadamente de 90%.
- O e-líquido completo, comportou-se inerte frente as exposições pela câmara Vitrocell® Cloud 12 system no modelo alveolar 3D avaliados por MTT.
- A viabilidade celular do modelo alveolar 3D foi reduzida em 30% após a exposição ao *flavor* de baunilha pela câmara Vitrocell® Cloud 12 system, avaliado pelo método de MTT.
- Observou-se no modelo alveolar 3D diferenças na constância tecidual, assim como o aumento no número de células do tecido e uma descamação da camada externa após a exposição ao *flavor* de baunilha pela câmara Vitrocell® Cloud 12 system.
- Os modelos e formas de exposição podem influenciar diretamente nos resultados celulares, sendo as metodologias aplicadas como complementares a avaliação dos produtos.

7 REFERÊNCIAS

AMBROSE B.K., DAY H.R., ROSTRON B., *et al.* **Flavored tobacco product use among US youth aged 12-17 years, 2013-2014.** JAMA.;314(17):1871–1873, 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 14 de 15 de março de 2012 que dispõe sobre os limites máximos de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono nos cigarros e a restrição do uso de aditivos nos produtos fumígenos derivados do tabaco, e dá outras providências.** Disponível em: <www.anvisa.gov.br>, acessado em 01/07/2020.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 46 de 28 de agosto de 2009 que dispõe sobre Comercialização, a importação e a propaganda de quaisquer dispositivos eletrônicos para fumar, conhecidos como cigarro eletrônico.** Disponível em: <www.anvisa.gov.br>, acessado em 20/07/2019.

AUFDERHEIDE, M. **Direct exposure methods for testing native atmospheres.** Experimental and Toxicologic Pathology, 57, pp.213-226, 2005.

BAGATIN, E.; COSTA, E. A. **Doenças das vias aéreas superiores.** J. bras. pneumol., São Paulo, v. 32, supl. 2, p. S17-S26, May 2006 . Disponível: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-7132006000800005&lng=en&nrm=iso>. acesso em 10 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000800005>.

BAHL, V., LIN, S., XU, N., DAVIS, B., WANG, Y.H., TALBOT, P., **Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models.** Reprod. Toxicol. 34, 529–537, 2012.

BEHAR, R.Z.; LUO, W.; LIN, S.C.; WANG, Y.; VALLE, J.; PANKOW, J.F.; TALBOT, P. **Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols.** Tob. Control., 25 (Suppl. 2), ii94–ii102, 2016.

CARPENTER CM, WAYNE GF, PAULY JL, KOH HK, CONNOLLY GN. **New cigarette brands with flavors that appeal to youth: tobacco marketing strategies.** Health Aff (Millwood).;24(6):1601–1610, 2005.

CDC, US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention **Update: Interim Guidance for Health Care Providers Evaluating and Caring for Patients with Suspected E-cigarette, or Vaping, Product Use Associated Lung Injury — United States**, Vol. 68 / No. 41, October 2019.

CDC. **Severe pulmonary disease associated with using e-cigarette products.** HAN alert No. 421. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, Health

CERVELLATI, F., MURESAN, X. M., STICOZZI, C. *et al.* (). **Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells.** *Toxicol In Vitro* 28, 999-1005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.012>, 2014.

CLIPPINGER, A.J., ALLEN, D., JARABEK, A.M., CORVARO, M., GAÇA, M., GEHEN, S., HOTCHKISS, J.A., PATLEWICZ, G., MELBOURNE, J., HINDERLITER, P. AND YOON,

M. **Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: an international workshop report.** *Toxicology in Vitro*, 48, pp.53-70, 2018a.

COREY CG, AMBROSE B.K., APELBERG B.J., KING B.A. **Flavored tobacco product use among middle and high school students--United States**, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(38):1066–1070

CZOLI CD, GONIEWICZ M, ISLAM T, KOTNOWSKI K, HAMMOND D. **Consumer preferences for electronic cigarettes: results from a discrete choice experiment.** *Tob Control.* 25(e1): e30–e36, 2016.

DAVIS B, DANG M., KIM J., TALBOT P. **Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it-yourself fluids.** *Nicotine Tob Res.* 2015; 17(2):134–41. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu080> PMID: 24862971.

DIAS M.A., SHUSTERMAN D., KESAVANATHAN J., SWIFT D.L., BASCOM R. **Upper airway diagnostic methods.** In: Harber P, Schenker MB, Balmes JR, editors. *Occupational and environmental respiratory disease.* St Louis: MosbyYearbook;. p.67-89, 1995.

DUTRA, L.M., GRANA, R; GLANTZ, S.A. **Philip Morris research on precursors to the modern e-cigarette since 1990.** *Tobacco control*, p. tobaccocontrol-2016053406, 2016.

FARSALINOS K.E., ROMAGNA G, TSIAPRAS D, KYRZOPOULOS S, SPYROU A, VOUDRIS V. **Impact of flavour variability on electronic cigarette use experience: an internet survey.** *Int J Environ Res Public Health.*;10(12):7272–7282, 2013.

FARSALINOS, K. E.; POLOSA, R. **Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarettes substitutes: a systematic review.** *Therapeutic Advances in Drug Safety*, v. 5, n. 2, p. 67-86, 2014.

FDA Lung Illnesses Associated with Use of Vaping Products. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/lung-illnesses-associated-use-vaping-products#Analysis>. Acessado em 10 de janeiro de 2020.

GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P., 1973. **In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.** *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417-1423. PubMed: 4357758

GIVENS, A.; CHENG, P. S. **I-Team: e-cigarettes, used to smoke marijuana, spark new concerns.** Disponível em: <<http://www.nbcnewyork.com/investigations/ECigarettes-Drugs-Marijuana-Vapor-Pens-Smoking-I-Team-227269001.html>>.

GRANA, R.; BENOWITZ, N.; GLANTZ, S. A. **Background Paper on E-cigarettes (Electronic Nicotine Delivery Systems).** Geneva: World Health Organization Tobacco Free Initiative, 2013.

GRANA, R.; Benowitz, N.; Glantz, S. A. **E-Cigarettes A Scientific Review.** *Circulation*, v. 129, n. 19, p. 1972-1986, 2014.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p 492-497 cap 37.

HAHN, J.; MONAKHOVA, Y.B.; HENGEN, J.; KOHL-HIMMELSEHER, M.; SCHUSSLER, J.; HAHN, H.; KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D.W. **Electronic cigarettes: overview of chemical composition and exposure estimation**. *Tob. Induc. Dis.*, 12, 23, 2014.
HAMM, J., SULLIVAN, K., *et al.*, 2017. **Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: moving from research to regulatory testing**. *Toxicol. in Vitro* 41, 245–259.

HARTNETT, K.P., KITE-POWELL, A., PATEL, M.T., HAAG, B.L., SHEPPARD, M.J., DIAS, T.P., KING, B.A., MELSTROM, P.C., RITCHEY, M.D., STEIN, Z., *et al.* **Syndromic Surveillance for E-Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury**. *N. Engl. J. Med.* 2019.

HARTUNG, T. **Food for Thought E-cigarettes and the Need and opportunities for Alternatives to Animal Testing**. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), Baltimore, MD, USA and CAAT- Europe, University of Konstanz, Germany. 2016.

HENRY, T.S.; KANNE, J.P.; KLIGERMAN, S.J. **Imaging of Vaping-Associated Lung Disease**. *N. Engl. J. Med.*, 381, 1486–1487, 2019.

HIGHAM, A., N. J. RATTRAY, J. A. DEWHURST, D. K. TRIVEDI, S. J. FOWLER, R. GOODACRE, *et al.* **Electronic cigarette exposure triggers neutrophil inflammatory responses**. *Respir. Res.* 17:56, 2016.

HODGE, S., G. HODGE, J. AHERN, H. JERSMANN, M. HOLMES, AND P. N. REYNOLDS. **Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease**. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37:748–755, 2007.

HUANG L.L., BAKER H.M., MEERNIK C., RANNEY L.M., RICHARDSON A., GOLDSTEIN A.O. **Impact of non-menthol flavours in tobacco products on perceptions and use among youth, young adults and adults: a systematic review**. *Tob Control.*;26(6):709–719, 2017.

HUTZLER, C. *et al.* **Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes**. *Archives of Toxicology*, v. 88, n. 7, p. 1295-1308, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; Carneiro, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 337-348, cap 17.

JUNQUEIRA, L. C.; Carneiro, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 2-3, cap 1.

LATIMER, K.M. **Lung Cancer: Clinical Presentation and Diagnosis**. *FP essentials*, 464, pp.23-26, 2018.

LEWIS MJ, WACKOWSKI O. **Dealing with an innovative industry: a look at flavored cigarettes promoted by mainstream brands.** *Am J Public Health.*;96(2):244–251, 2006.

LINE H *et al.* **Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and metaanalysis.** *PLoS Medicine*, 2007.

LU, M.A.; JABRE, N.A.; MOGAYZEL, P.J., JR. **Vaping-Related Lung Injury in an Adolescent.** *Am. J. Respir. Crit.Care Med.* 2020.

MATTA P, HAMATI JN, UNNO HL, *et al.* **E-cigarette or Vaping Product Use–Associated Lung Injury (EVALI) Without Respiratory Symptoms.** *Pediatrics.*;145(5):e20193408,2020.

MATTHAY M.A., ZEMANS R.L., ZIMMERMAN G.A., *et al.* **Acute respiratory distress syndrome.** *Nat Rev Dis Primers*;5:18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>, 2019.

MOREAN ME, BUTLER ER, BOLD KW, *et al.* **Preferring more e-cigarette flavors is associated with e-cigarette use frequency among adolescents but not adults.** *PLoS One.*;13(1):e0189015, 2018.

MUKHOPADHYAY, S., MEHRAD, M., DAMMERT, P., ARROSSI, A. V., SARDA, R., BRENNER, D. S., GHOBRIAL, M. **Lung biopsy findings in severe pulmonary illness associated with E-cigarette use (vaping) A report of eight cases.** *American Journal of Clinical Pathology*, 153(1), 30-39, 2020.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. **Public Health Consequences of E-Cigarettes**; Eaton, D.L., Kwan, L.Y., Stratton, K., Eds.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2018.

NORDGREN, T.M., BAILEY, K.L. **Pulmonary health effects of agriculture.** *Current opinion in pulmonary medicine*, 22(2), p.144, 2016.

OLGA, Seizi; CAMARGO, Márcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. **Fundamentos de toxicologia.** 4.ed. São Paulo: Atheneu editora São Paulo. p.09-30, cap 1.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde, Brasil, **10 Principais causas de morte no mundo.** Nota informativa atualizada em maio de 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0. Acessado junho de 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT- OECD, **Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing.** Series on Testing and Assessment No. 39,ENV/JM/MONO(2009) 28. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)28/rev1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)28/rev1&doclanguage=en) . 2009c.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Neurociência do uso e da dependência de substâncias psicoativas.** São Paulo: Roca, 2006.

PARENT, R.A. **Comparative Biology of the Normal Lung.** Academic Press, New York, 2015.

PATLEWICZ, G., SIMON, T.W., *et al.*, 2015. **Proposing a scientific confidence framework to help support the application of adverse outcome pathways for regulatory purposes.** Regul. Toxicol. Pharmacol. 71 (3), 463–477, 2015.

PHILLIPS, B.; TITZ, B.; KOGEL, U.; SHARMA, D.; LEROY, P.; XIANG, Y.; VUILLAUME, G.; LEBRUN, S.; SCIUSCIO, D.; HO, J.; *et al.* **Toxicity of the main electronic cigarette components, propylene glycol, glycerin, and nicotine, in Sprague-Dawley rats in a 90-day OECD inhalation study complemented by molecular endpoints.** Food Chem. Toxicol., 109 Pt 1, 315–332, 2017.

PRYTHERCH, Z., BÉRUBÉ, K. **Advances in in-vitro 3D lung cell culture.** In: Haycock, J., Ahluwalia, A., Wilkinson, M.J. (Eds.), Cellular In Vitro Testing: Methods and Protocols. Pan Stanford Publishing, Singapore, 2014a.

RACH, J., BUDDE, J., MÖHLE, N., AUFDERHEIDE, M. **Direct exposure at the air–liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances.** Journal of Applied Toxicology, 34(5), pp.506-515, 2014.

SASSANO, M. FLORI *et al.* **Evaluation of e-liquid toxicity using an open-source highthroughput screening assay.** PLoS biology, v. 16, n. 3, p. e2003904, 2018.

SCHIER JG, MEIMAN JG, LAYDEN J, *et al.*, CDC **Lung Injury Response Group. Severe pulmonary disease associated with electronic-cigarette-product use – interim guidance.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep; 68;787-90. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6836e2>, 2019.

SERVICES USDOHAH. **E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults. A Report of the Surgeon General.** In: Services USDoHaH, editor. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2016.

SILVA, Penildon. **FARMACOLOGIA.** 8a Ed. Rio de Janeiro (RJ). Guanabara Koogan, 2010. p 730-733, cap 71.

SINGH T, ARRAZOLA RA, COREY CG, *et al.* **Tobacco use among middle and high school students--United States, 2011-2015.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep.;65(14):361–367, 2016. SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA HOSPITAL ALBERT EINSTEIN. **Álcool e Drogas sem Distorção.** São Paulo: Abert Einstein, 2009.

SUSSAN, T. E., S. GAJGHATE, R. K. THIMMULAPPA, J. MA, J. H. KIM, K. SUDINI, *et al.* **Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model.** PLoS ONE 10: e0116861, 2015.

SYDBOM, A., BLOMBERG A., PARNIA S., STENFORS A., SANDSTRM T., DAHLÉN S-E. **Health effects of diesel exhaust emissions.** European Respiratory Journal, 17: 733-746. Outubro de 2001.

TACKETT A.P., LECHNER W.V., MEIER E., *et al.* **Biochemically verified smoking cessation and vaping beliefs among vape store customers.** *Addiction.*;110(5):868–874, 2015.

TATSUTA M., KAN-O K., ISHII Y., YAMAMOTO N., OGAWA T., FUKUYAMA S., OGAWA A., FUJITA A., NAKANISHI Y., MATSUMOTO K. **Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium: protective role of cathelicidin LL-37.** *Respiratory Research* 20:251 <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1226-4>, 2019.

TISSERAND, R., YOUNG, R. Chapter 6. **The Respiratory System. Essential Oil Safety** (Second Edition) A Guide for Health Care Professionals, p. 99-110, 2014.

TOLLSTADIUS, B.F. **Avaliação dos efeitos da exposição de células pulmonares alveolares a aerossóis de Carbendazim.** 2019. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia Go, 2019.

TOLLSTADIUS, B.F; *et al*; **Carbendazim induces death in alveolar epithelial cells: A comparison between submerged and at the air-liquid interface cell culture.** *Toxicology in Vitro journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit*. 2019.

TRABOULSI, H., CHERIAN, M., ABOU RJEILI, M., PRETEROTI, M., BOURBEAU, J., SMITH, B. M. EIDELMAN D. H., BAGLOLE, C. J. **Inhalation Toxicology of Vaping Products and Implications for Pulmonary Health.** *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 3495; doi:10.3390/ijms21103495, 2020.

TSUKITA S, TANAKA H, TAMURA A. **The Claudins: from tight junctions to biological systems.** *Trends Biochem Sci.*;44:141–52, 2019.

WEBER, S.; HEBESTREIT, M.; WILMS, T.; CONROY, L.L.; RODRIGO, G. **Comet assay and air-liquid interface exposure system: a new combination to evaluate genotoxic effects of cigarette whole smoke in human lung cell lines.** *Toxicology In Vitro*, 27 (6), p.1987-1991, 2013.

WEEN, M. P. *et al.*, **Phagocytosis and Inflammation: Exploring the effects of the components of E-cigarette vapor on macrophages.** *Physiological reports*, v. 5, n. 16, 2017.

ZHU, S.H. *et al.* **Four hundred and sixty brands of ecigarettes and counting: Implications for product regulation.** *Tob Control* 23, Suppl 3, iii3-9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2014-051670>>, 2014.