

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIANA DE MELO CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA APLICAÇÃO NA ÁREA BIOMÉDICA**

CRICIÚMA, MARÇO DE 2021

MARIANA DE MELO CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA APLICAÇÃO NA ÁREA BIOMÉDICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

Coorientadora: Prof. Dra. Flávia Karine Rigo

CRICIÚMA, MARÇO DE 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C268a Cardoso, Mariana de Melo.

Avaliação da biocompatibilidade de nanopartículas poliméricas para aplicação na área biomédica / Mariana de Melo Cardoso. - 2021.
65 p. ; il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.
Coorientação: Flávia Karine Rigo.

1. Nanopartículas poliméricas - Aplicações biomédicas. 2. Nanopartículas magnéticas - - Aplicações biomédicas. 3. Biocarreadores. 4. Estresse oxidativo. 5. Dopamina. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.19

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 379

Com início às 09h (nove horas) do dia seis de abril de 2021 (dois mil e vinte e um), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MARIANA DE MELO CARDOSO**, sob a orientação do Prof. Dr. **Ricardo Andrez Machado de Ávila** e coorientação da Profa. Dra. **Flávia Karine Rigo**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA APLICAÇÃO NA ÁREA BIOMÉDICA**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 10h (dez horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 06 (seis) de abril de 2021 (dois mil e vinte e um).

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e com adaptações descritas na Resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Ela será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto do esforço de muitas pessoas extraordinárias a quem não posso deixar de agradecer. Agradeço especialmente à minha mãe, pelos conselhos, pelo apoio, pelo amor e principalmente pelo exemplo. Vê-la prosperar, sempre forte, persistente e feliz acima de tudo, é o meu maior incentivo. Ao meu namorado, por estar sempre ao meu lado.

Ao meu querido orientador, professor Ricardo Andrez que com muita sabedoria guiou meu caminho, mantendo meus pés no chão e que ao longo desses anos dividiu tanto conhecimento comigo. À professora Flávia Rigo, que foi em grande parte responsável pela minha entrada no programa e com quem sempre pude contar. Ao professor Paulo Feuser, que idealizou este projeto e me presenteou com ele. Obrigada por estar prontamente disposto a colaborar, sempre com muita paciência e bom humor. Aos meus colegas de laboratório Mírian, Nathalia, Rahisa e Gustavo que por inúmeras vezes me ajudaram muito mais do que eu merecia. Todos eles têm uma jornada brilhante pela frente, da qual eu espero fazer parte. Aos demais colegas e amigos, o meu muito obrigada. Saibam que é um prazer estar ao lado de vocês.

A todos os citados, tenham a certeza de que toda ajuda e companhia, palavras, risadas e conselhos foram imprescindíveis para a conclusão desta etapa e serão para sempre lembrados com muito carinho.

Por fim agradeço à FAPESC, CNPq, CAPES e UNESC, órgãos de fomento dos estudos realizados.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

- Carl Sagan

RESUMO

Nanopartículas (NPs) são estruturas com tamanho submicrométrico, que em razão de seu tamanho, interagem com diferentes funções celulares. Partículas sintetizadas em nanoescala apresentam propriedades biológicas, químicas, mecânicas, magnéticas, com impactos significativos no diagnóstico e na terapia para o tratamento de diferentes doenças humanas. Estes materiais possuem um grande potencial para serem utilizados na área biomédica, podendo ser empregados no desenvolvimento de diferentes biocarreadores de fármacos, graças à sua capacidade de atravessar múltiplas barreiras biológicas e liberar uma carga terapêutica na faixa de dosagem ideal. NPs poliméricas obtidas por polimerização de tiol-eno têm recebido atenção de muitos pesquisadores devido à sua versatilidade na composição e estrutura e às suas inúmeras vantagens, entre elas, a possibilidade de ser biocompatíveis e biodegradáveis. No entanto, a aplicabilidade de novos nanomateriais na área da saúde requer estudos rigorosos a respeito da toxicidade e biodistribuição destas NPs. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade de NPs de politioéter-éster (PTEe) e de NPs magnéticas revestidas de politioéter-éster (PTEe-MNPs) obtidas por polimerização de tiol-eno. Para tal, após a caracterização das NPs, doses de 20mg/kg foram injetadas por via intraperitoneal em camundongos Swiss e os parâmetros comportamentais e bioquímicos foram investigados em cinco órgãos diferentes. 24 horas após a administração, foram realizados os testes de von Frey, acetona, teste de retirada da cauda, teste de campo aberto e rotarod. Após a avaliação dos parâmetros comportamentais, foram avaliados o conteúdo de dopamina em diferentes regiões do cérebro e os parâmetros de estresse oxidativo (DCFH, nitrito, carbonil, sulfidril, SOD e GSH). As NPs apresentaram tamanho na faixa de 120 nm, morfologia esférica e carga superficial negativa. Nenhuma das NPs apresentou alterações comportamentais significativas. Em nenhum dos tecidos avaliados foi observado o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo, pelo contrário, em alguns tecidos as NPs apresentaram um comportamento potencialmente antioxidante. Foi observada uma redução significativa nos níveis de dopamina no tecido estriado, porém são necessários mais estudos para confirmar uma possível toxicidade. Coletivamente, nossos resultados sugerem que ambas as NPs não induzem toxicidade aguda aos diferentes órgãos avaliados, indicando que elas podem ser consideradas biocompatíveis e potenciais carreadores para serem associados a fármacos e utilizados na área biomédica.

Palavras-chave: NPs poliméricas, nanopartículas magnéticas, biocarreadores, biocompatibilidade, estresse oxidativo, parâmetros comportamentais.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are structures with submicrometric size, which, due to their size, interact with different cellular functions. Particles synthesized at a nanoscale have biological, chemical, mechanical and magnetic properties, with significant impacts on diagnosis and therapy for the treatment of different human diseases. These materials have great potential in the biomedical field, and can be used in the development of different biocarriers of drugs, thanks to their ability to overcome multiple biological barriers and release a therapeutic load in the ideal dosage range. Polymeric NPs obtained by thiol-ene polymerization have received attention from many researchers due to their versatility in composition and structure and their numerous advantages, including the possibility of being biocompatible and biodegradable. However, the applicability of new nanomaterials in the health area requires rigorous studies of the toxicity and biodistribution of these NPs. Thus, the aim of this study was to evaluate the biocompatibility of polythioether ester NPs (PTEe) and magnetic NPs coated with polythioether ester (PTEe-MNPs) obtained by thiol-ene polymerization. For this, after the characterization of the NPs, doses of 20mg/kg were injected intraperitoneally into Swiss mice and the behavioral and biochemical parameters were investigated in five different organs. 24 hours after administration, von Frey test, acetone, tail-flick test, open field and rotarod were performed. After evaluating the behavioral parameters, the dopamine content in different regions of the brain and the oxidative stress parameters (DCFH, nitrite, carbonyl, sulfhydryl, SOD and GSH) were evaluated. The NPs had a size in the range of 120 nm, spherical morphology and negative surface charge. None of the NPs showed significant behavioral changes. In none of the evaluated tissues was observed the development of an oxidative stress condition, on the contrary, in some tissues the NPs showed a potentially antioxidant behavior. A significant reduction in dopamine levels has been observed in striated tissue, but further studies are needed to confirm possible toxicity. Collectively, our results suggest that both NPs do not induce acute toxicity to the different evaluated organs, indicating that they can be considered biocompatible and potential carriers to be associated with drugs and used in the biomedical field.

Keywords: Polymeric NPs, magnetic NPs, biocarriers, biocompatibility, oxidative stress, behavioral parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Caracterização das NPs.....	33
Figura 2. Limiar de nocicepção.....	34
Figura 3. Desempenho motor na locomoção forçada.....	35
Figura 4. Função motora.....	36
Figura 5. Fígado.....	38
Figura 6. Rins.....	39
Figure 7. Pulmão.....	40
Figura 8 Gastrocnêmio.....	42
Figura 9. Coração.....	43
Figura 10. Conteúdo de dopamina.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro médio de intensidade das nanopartículas (DP), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta.....	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN	Azobisisobutironitrila
AO	Ácido oleico
BDT	Butanoditiol
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês: <i>High Performance liquid chromatography</i>
IP	Intraperitoneal
NPs	Nanopartículas
NPMs	Nanopartículas magnéticas
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
PTEe	Nanopartículas de polioéter-éster
PTEe-NPM	Polioéter-éster associado a nanopartículas magnéticas
SDS	Dodecilsulfato de sódio
α,ω-dienos	alfa,ômega-dienos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	16
1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS NANOPARTÍCULAS	17
1.3 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	24
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
3.3 MATERIAIS.....	25
3.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	25
3.4.1 Preparação de nanopartículas de poli (tioéter-éster) superparamagnético (PTEe-NPMs).....	26
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA	27
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	27
3.6.1 Hiperalgesia mecânica – teste de von Frey	27
3.6.2 Teste de campo aberto (Open Field)	28
3.6.3 Teste da acetona	28
3.6.4 Teste de retirada da cauda (Tail Flick).....	28
3.6.5 Teste de Rotarod	29
3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	29
3.7.1 Preparação das amostras para análises bioquímicas.....	29
3.7.2 Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico	29
3.7.3 Determinação dos marcadores de dano oxidativo	30
3.7.4 Determinação de defesas antioxidantes	30
3.7.5 Conteúdo de proteínas	30
3.8 ANÁLISE DE HPLC-FD DO CONTEÚDO DE DOPAMINA.....	30
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	32
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	33
4.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	36
4.4 CONTEÚDO DE DOPAMINA.....	44

5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO.....	55
ANEXO	64

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas (NPs) são estruturas com tamanho submicrométrico, que podem ser preparadas através de uma grande variedade de métodos e classificadas pelas suas propriedades físicoquímicas, como tamanho, morfologia, composição (polímeros, lipídeos, materiais inorgânicos), potencial zeta e origem (natural ou sintético) (Neufeld, 2006;Elsabahy; Wooley, 2013; Jain; Jain; Mahajan, 2015; Reis; Sukhanova et al., 2018). Transpondo a barreira entre ciências biológicas e físicas com a aplicação de nanoestruturas em diferentes campos da ciência, as NPs tornaram-se amplamente utilizadas na agricultura, medicina, eletrônica e muitas outras indústrias. Devido ao seu tamanho reduzido e propriedades únicas, nos últimos anos a nanobiotecnologia tem contribuído significativamente na área biomédica para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e diagnósticos (Sukhanova et al., 2018).

Atualmente existem nanomateriais provenientes de diversas fontes, com características distintas e específicas. Por exemplo, nanotubos de carbono e NPs constituídas de metais, geraram um grande interesse comercial devido às suas notáveis propriedades intrínsecas, como alta resistência à tração e condutividade (Sharifi et al., 2012). No entanto, em uma época de aumento dos preços do petróleo, aquecimento global e outros problemas ambientais, o uso de matérias-primas renováveis pode ser uma contribuição significativa para o desenvolvimento sustentável. Neste sentido, os óleos vegetais são a matéria-prima renovável mais importante para a indústria química. São triglicerídeos com diferentes composições de ácidos graxos, dependendo da planta, safra, estação e condições de crescimento (Liechty et al., 2010;Jain; Jain; Mahajan, 2015)

Os ácidos graxos são usados para o desenvolvimento de estruturas poliméricas, seja diretamente ou como base para a síntese de monômeros mais sofisticados. Estes são materiais renováveis valiosos para a síntese de monômeros que contêm propriedades específicas e não requerem extensa modificação química antes de sua aplicação (Iqbal et al., 2012).

NPs obtidas de polímeros, ou NPs poliméricas, são sistemas carreadores de fármacos, que possuem diâmetros menores que 1 μm e podem variar em tamanho dependendo do campo de aplicação (Schaffazick; Guterres, 2003) Essas

NPs também podem ser classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas. Nas nanoesferas, o composto encapsulado é homogeneamente disperso ou solubilizado na matriz polimérica, obtendo-se um sistema monolítico no qual não é possível identificar um núcleo diferenciado. As nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o material encapsulado é retido em uma cavidade, consistindo em um interior com o núcleo líquido envolto por uma matriz polimérica (Reis; Neufeld, 2006).

Existem métodos variados relatados na literatura para a preparação de NPs poliméricas, incluindo polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou através da precipitação de polímeros pré-formados (Feuser et al., 2015; Mattos dos Santos et al., 2018). Dentre os principais métodos de preparação de NPs *in situ*, pode-se destacar a polimerização em miniemulsão, através desta técnica é possível sintetizar NPs com propriedades únicas, incluindo a incorporação de substâncias ou NPs inorgânicas em apenas um passo com uma única reação (Romio et al., 2009 Landfester; Mailänder; Maila, 2013; Feuser et al., 2015).

O uso de NPs poliméricas para a liberação de substâncias resulta em concentrações maiores e mais localizadas do fármaco em um local específico, reduzindo os efeitos tóxicos em células ou tecidos saudáveis, representando assim uma estratégia para o diagnóstico e tratamento de doenças. NPs poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos (Landfester; Mailänder, 2013). Estes polímeros têm aplicações prospectivas na liberação de medicamentos, pois podem ser decompostos em moléculas menores sob estímulos biológicos específicos (Machado et al., 2017).

A polimerização de tiol-eno é uma ferramenta promissora para a síntese de NPs poliméricas a partir de fontes renováveis com potencial para uso em carreamento de medicamentos devido ao seu potencial para modificação da superfície (Cardoso et al., 2017; Liu et al., 2017; Machado et al., 2017). Biomateriais inovadores surgem a partir desta técnica devido ao interesse em seus atributos únicos, incluindo condições de reação amenas, taxas de reação rápidas e sem formação de subprodutos (Jasinski et al., 2014). Esta técnica tornou-se uma ferramenta versátil para a produção de polímeros a partir de monômeros α , ω -dienos inteiramente renováveis com grupos funcionais como éster, éter e amida na cadeia principal. A presença destes grupos, como por exemplo o éster, é de grande

importância pois estes podem ser facilmente hidrolisados e, portanto, são potencialmente biodegradáveis (Machado et al., 2017).

Somente a partir de 2012, artigos descrevendo a síntese de polímeros lineares por polimerização de tiol-eno foram publicados (Iqbal et al., 2012; Cardoso et al., 2018). Além de evitar o uso de solventes orgânicos, a grande vantagem da polimerização em miniemulsão é a possibilidade de produzir nanoestruturas complexas, incluindo o encapsulamento de NPs inorgânicas, em uma única etapa (Machado et al., 2017; De Meneses et al., 2018) Além disso, esta técnica apresenta vantagens, como melhor controle do tamanho de partícula, a possibilidade de dispersar as partículas inorgânicas e hidrofóbicas diretamente na fase contendo o monômero com o auxílio de um estabilizador nuclear e, dependendo da formulação, produzir dispersões de NPs biocompatíveis (Cardoso et al., 2017; Mattos dos Santos et al., 2018).

1.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

NPs magnéticas (NPMs) também têm importantes aplicações biomédicas como sistemas teranósticos, uma vez que permitem a distribuição concomitante de drogas direcionadas magneticamente e imagens de tecidos por meio de ressonância magnética (Chircov; Grumezescu; Andronescu, 2021).

As NPMs são excelentes nanoplataformas para a entrega de medicamentos e tratamento oncológico, devido a sua biocompatibilidade e comportamento superparamagnético (Wahajuddin; Arora, 2012; Hauser et al., 2015; Mattos dos Santos et al., 2018; Avval et al., 2019; Feuser et al., 2020). Elas auxiliam na liberação do fármaco porque, além de seu tamanho reduzido e baixa toxicidade, as NPMs podem ser transportadas por um campo magnético, penetrando profundamente no tecido humano (Gupta et al., 2019). Elas podem ainda ser utilizadas para atingir células-alvo, como células tumorais, através da hipertermia. Considerando que as células cancerosas são mais sensíveis a temperaturas superiores a 41°C do que as células saudáveis (Landfester; Mailänder; Maila, 2013), é possível provocar a morte das células tumorais utilizando a produção de calor pela aplicação de um campo magnético alternado externo ao local do tumor (Feuser et al., 2015), muitas vezes em combinação com quimioterapia.

As propriedades físicas como tamanho, forma, natureza hidrofílica, carga superficial e comportamento magnético são responsáveis pela biodistribuição e biocompatibilidade das NPs. As propriedades químicas como composição do núcleo e revestimento também são responsáveis pela biocompatibilidade, bem como pela ligação de diferentes moléculas para eficácia terapêutica (Gupta et al., 2019). Devido a sua tendência a agregação, NPMs podem ser facilmente encapsuladas em NPs poliméricas, para melhorar a sua solubilidade e estabilidade coloidal, prevenindo possíveis aglomerações e protegendo contra possível oxidação (Wahajuddin; Arora, 2012). A natureza duplamente funcional das NPMs como agentes de imagem e carreadoras de produtos farmacêuticos para alvos específicos sob um gradiente de campo magnético, tornou-as agentes de entrega atraentes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Feuser et al., 2015).

Estudos recentes com encapsulamento de NPMs via miniemulsão de tiol-eno foram reportados na literatura por Hoelscher et al (2018). Neste estudo, os autores mostraram com sucesso a síntese de nanopartículas de poli-tioeter-ester (PTEe) superparamagnéticas (PTEe-NPMs) via miniemulsão de tiol-eno utilizando dois tipos de tiol diferentes (ditiol e tetratiol) e avaliaram com sucesso a sua toxicidade *in vitro* em células de câncer de mama humano (MDA-MB 231) por hipertermia (De Meneses et al., 2018; Hoelscher et al., 2018). Mattos dos Santos et al., avaliaram NPs magnéticas encapsuladas em PTEe via miniemulsão e evaporação de solvente (Mattos dos Santos et al., 2018). Neste estudo, a biocompatibilidade foi confirmada em um estudo *in vitro* e a citotoxicidade foi confirmada em células de câncer cervical humano (HeLa) por hipertermia.

1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS NANOPARTÍCULAS

As associações com NPs mostraram ser um efetivo sistema de entrega de medicamentos, tendo como principal objetivo o direcionamento da substância ao tecido ou célula alvo, melhorando a sua absorção, biodisponibilidade e diminuindo os efeitos tóxicos. (Bernardy et al., 2010; Elsabahy; Wooley, 2013; Jain; Jain; Mahajan, 2015; Ulbrich et al., 2016). Alguns tipos de NPs já são usadas com sucesso na clínica para entrega de drogas, imagenologia de células tumorais (Ma; Zou; Chen, 2014), como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica e na destruição hipertérmica de tumores através da incorporação de NPs e aquecimento

(Phillips et al., 2016). No diagnóstico, as NPs podem servir como agentes fluorescentes para detecção de biomoléculas e patógenos, como agentes de contraste em ressonância magnética, entre outros (Núñez; Estévez; Del Pilar Chantada, 2018).

Atualmente, o principal fator que limita o uso de NPs no tratamento e diagnóstico de doenças é a toxicidade em organismos vivos. O equilíbrio entre o efeito terapêutico positivo e os efeitos colaterais relacionados à sua toxicidade é objeto de estudo de diversas pesquisas (Hu; Gao, 2010; Weiss et al., 2021). A toxicidade das NPs é principalmente determinada por suas características fisicoquímicas como tamanho, forma, área superficial específica, carga superficial e atividade catalítica (Sukhanova et al., 2018).

O pequeno tamanho das NPs permite que elas atravessem barreiras epiteliais e endoteliais. Assim, podem chegar à corrente sanguínea e ao sistema linfático, sendo distribuídas a diferentes órgãos e tecidos, incluindo o cérebro, coração, fígado, rins, entre outros (Singh; Lillard, 2009). Uma vez no tecido, são transportadas para as células por mecanismos de transcitose ou simplesmente difundidas através da membrana celular. Elas podem ainda, extravasar através de tumores e penetrar microcapilares (Fornaguera et al., 2015).

As NPs são caracterizadas por uma área de superfície específica muito grande, que determina sua alta capacidade de reação e atividade catalítica. Os tamanhos de NPs de 1 a 100 nm são comparáveis com o tamanho de glóbulos de proteína (2–10 nm), diâmetro da hélice de DNA (2 nm), e espessura das membranas celulares (10 nm), o que permite que elas entrem facilmente nas células e organelas celulares (Schmid, 2008; Soenen et al., 2011). Além disso, o tamanho determina em grande parte como as NPs interagem com os sistemas de transporte e defesa das células. Essa interação, por sua vez, afeta a cinética de metabolização e o acúmulo no organismo. Estudos mostram que NPs menores que 5 nm geralmente superam barreiras celulares de forma não específica, por exemplo, via translocação, enquanto as partículas maiores entram nas células por fagocitose e outros mecanismos de transporte específicos (Elsabahy; Wooley, 2013; Zhang; Gao; Bao, 2015).

Um estudo sobre a atividade hemolítica de mesoporos de sílica de 100 a 600 nm em eritrócitos humanos mostrou que a grande área de superfície específica garante uma adsorção eficaz de NPs na superfície celular (Zhao et al., 2011). As partículas de 100 nm foram efetivamente adsorvidas na superfície do eritrócito sem

causar alterações morfológicas ou destruição celular, enquanto as partículas de 600 nm foram capazes de provocar deformações na membrana celular suficientes para atravessá-la, causando hemólise.

De acordo com o tamanho, as NPs podem entrar não apenas em órgãos, tecidos e células, mas também em organelas. Elas podem perturbar o metabolismo celular através da interação com mitocôndrias e núcleos e gerar um desequilíbrio de energia, lesões no DNA, mutações e necrose (Barua; Mitragotri, 2014). A interação de NPs com o citoesqueleto também pode danificá-lo. Por exemplo, NPs de TiO₂ induzem mudanças conformacionais na tubulina e inibem sua polimerização, o que perturba o transporte intracelular e a divisão celular (Wu et al., 2010)

Além disso a citotoxicidade das NPs pode interferir com a diferenciação celular e síntese proteica, pois causam mudanças estruturais nas proteínas de membrana e podem prejudicar o transporte intra ou extracelular de substâncias. Podem ainda ativar genes pró-inflamatórios provocando a síntese de mediadores e perturbando os mecanismos fisiológicos do metabolismo celular (Fornaguera et al., 2015).

A oxidação e a ação de enzimas sobre a superfície das NPs resulta em sua degradação e produção de radicais livres, como espécies reativas e oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) (Yang et al., 2021). Além de provocar oxidação e inativação de enzimas, mutagênese e distúrbio de reações químicas levando à morte celular, a presença de radicais livres resultante da degradação das NPs leva a alteração ou perda de sua própria funcionalidade (Thakor et al., 2011; Weiss et al., 2021).

EROs são geradas intrínseca ou extrínsecamente nas células. Algumas das fontes endógenas de EROs incluem respiração mitocondrial, resposta inflamatória, microsomas e peroxissomos, enquanto nanomateriais sintéticos e poluentes ambientais atuam como indutores exógenos (Pushpakumar; Kundu; Sen, 2014; Yang et al., 2021). Fisiologicamente, EROs são produzidas em pequenas quantidades em resposta a vários estímulos, pois ocorrem como subprodutos essenciais da respiração mitocondrial. Fagócitos inflamatórios como neutrófilos e macrófagos induzem uma resposta oxidativa como mecanismo de defesa contra poluentes ambientais, células tumorais e microrganismos (Li; Xia; Nel, 2008).

Uma variedade de NPs, incluindo partículas de metal e de óxido induzem EROs como um dos principais mecanismos de citotoxicidade (Risom; Møller; Loft, 2005). Estudos mostram que as NPs influenciam concentrações intracelulares de cálcio, ativam a transcrição de fatores, e modulam a produção de citocinas por meio da produção de radicais livres (Jia et al., 2010). A presença excessiva de EROs pode causar prejuízo às respostas biológicas, resultando em um quadro de estresse oxidativo. Este fenômeno é o resultado de um desequilíbrio entre o produção de EROs e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar os intermediários reativos ou reparar o dano (Huang et al., 2010; Thakor et al., 2011).

Estudos que avaliaram a relação entre NPs e a formação de EROs, mostraram que as células e tecidos respondem a níveis crescentes de estresse oxidativo por meio de sistemas antioxidantes enzimáticos após exposição às NPs (Li; Xia; Nel, 2008; Huang; Wu; Aronstam, 2010). No entanto, níveis altos e contínuos de estresse oxidativo ocasionam danos à membrana mitocondrial e disfunção na cadeia transportadora de elétrons levando à morte celular (Huang et al., 2010).

Foi demonstrado que nanoesferas catiônicas de poliestireno induzem apoptose mediada por $O_2^{\cdot-}$, em macrófagos murinos, com base em sua capacidade de atingir a mitocôndria (Tian Xia et al., 2006). Além disso, a internalização celular de NPs ativa células do sistema imune, incluindo macrófagos e neutrófilos, contribuindo para a produção de EROs e ERNs (Risom; Møller; Loft, 2005; Dayem et al., 2017).

Alguns dos principais fatores que favorecem os efeitos pró-oxidantes de nanomateriais sintéticos incluem a depleção de antioxidantes endógenos e o aumento excessivo da produção de EROs. Dada a sua reatividade química, o estresse oxidativo pode resultar em danos ao DNA, peroxidação lipídica e ativação de cascatas de sinalização associadas à perda de células de crescimento, fibrose e carcinogênese (Valko et al., 2006; Buzea; Pacheco; Robbie, 2007) .

1.3 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS

No tratamento do câncer, um dos principais problemas é a incapacidade de penetração eficaz de medicamentos quimioterápicos. Mesmo drogas formuladas

com moléculas pequenas geralmente podem penetrar poucas camadas celulares devido ao aumento de anormalidades na vasculatura e na viscosidade (Barua; Mitragotri, 2014). Uma característica importante de vários tipos de tumores sólidos é a disponibilidade reduzida de oxigênio (hipóxia), que está altamente associada a uma vasculatura deficiente. Ainda que a angiogênese seja induzida na região tumoral, o crescimento das células cancerosas é mais rápido, resultando em suprimento insuficiente de nutrientes e oxigênio para o tecido adjacente. Este fenômeno leva ao desenvolvimento de resistência das células tumorais à quimioterapia e radioterapia (Angelopoulou et al., 2017). Neste contexto, as propriedades das NPs magnéticas podem permitir que as NPs explorem a vasculatura e sejam localizadas na área tumoral (mesmo na zona hipóxica), por meio da aplicação de gradientes de campo magnético localizados (Hauser et al., 2015; Núñez; Estévez; Del Pilar Chantada, 2018).

A liberação gradual de drogas carregadas por NPs por estímulos externos, como temperatura, radiação de luz, campos elétricos ou magnéticos e mudanças no pH (Hauser et al., 2015; Ulbrich et al., 2016; Avval et al., 2019) atraiu muita atenção para seu potencial na regulação e manutenção da administração de drogas em uma faixa de concentração terapêutica desejada no local da doença. A liberação localizada e controlada do medicamento melhora a sua eficácia e minimiza os efeitos colaterais tóxicos (Alexis et al., 2008)

As formulações de liberação controlada podem ser usadas para reduzir a quantidade de medicamento necessária para apresentar a mesma eficácia terapêutica, no tratamento de diversas doenças. Além disso, o uso de um número menor de doses, de forma mais eficaz, também contribui com a adesão do paciente ao tratamento (Liechty et al., 2010). Em diversas formulações de liberação controlada, imediatamente após a dispersão do medicamento no meio, uma grande quantidade do fármaco é liberada inicialmente antes que as taxas de liberação assumam um perfil estável. Pesquisadores procuram evitar este fenômeno pois altas taxas de liberação inicial podem levar a concentrações próximas ou acima do nível de toxicidade *in vivo* (Su et al., 2008). Nestes casos, mesmo na ausência de efeitos tóxicos para o paciente, a quantidade de medicamento utilizada é essencialmente desperdiçada.

Embora existam vários mecanismos de toxicidade das NPs, é necessário determinar a biocompatibilidade de NPs específicas, de acordo com suas

propriedades físicas e químicas. Assim, a escolha de um modelo experimental adequado para estimar a toxicidade entre *in vitro* e *in vivo* é de suma importância (Sharifi et al., 2012; Sukhanova et al., 2018; Weiss et al., 2021).

Apesar dos estudos *in vitro* reportados na literatura de NPs obtidas por polimerização de tiol-eno, são necessários estudos *in vivo* para avaliar o comportamento destes materiais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda da administração intraperitoneal (IP) de NPs de Politioéter-éster (PTEe) e NPs de PTEe associadas com NPs magnéticas (PTEe+NPMs) na concentração de 20mg/kg em camundongos, onde foram avaliados parâmetros comportamentais e bioquímicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a biocompatibilidade de dois sistemas nanoparticulados poliméricos em camundongos, através de parâmetros bioquímicos e comportamentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar dois sistemas nanoparticulados de (1) politioéter-éster e (2) politioéter-éster com propriedades supermagnéticas.

- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo (Produção de oxidantes, danos oxidativos e atividade antioxidante) em diferentes órgãos de camundongos após administração única de dois sistemas nanoparticulados de (1) politioéter-éster e (2) politioéter-éster com propriedades supermagnéticas.

- Avaliar o conteúdo de dopamina em diferentes estruturas de cérebros de camundongos após administração única de dois sistemas nanoparticulados de (1) politioéter-éster e (2) politioéter-éster com propriedades supermagnéticas.

- Avaliar a atividade comportamental de camundongos após administração única de dois sistemas nanoparticulados de (1) politioéter-éster e (2) politioéter-éster com propriedades supermagnéticas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 18 camundongos Swiss adultos machos, pesando entre 18 e 22g, com idade entre 28-35 dias. Os animais foram obtidos do Centro de Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Estes foram alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas claro-escuro, com temperatura controlada de 22 ± 1 °C. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UNESC e aceito sob o protocolo 063/2017-1, conforme a Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008 do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), conduzido de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O projeto foi realizado em duas etapas que compreenderam a síntese e a avaliação da toxicidade das NPs. Primeiramente foi realizada a síntese das NPs de politioéter-éster (PTEe) e das NPs superparamagnéticas encapsuladas em politioéter-éster (PTEes-NPMs) através dos métodos descritos a seguir. Após a síntese, foram injetados 20mg/kg, por via IP, de PTEe, PTEe-NPMs ou PBS de acordo com os respectivos grupos. Os testes comportamentais foram realizados 24 horas após a administração, seguidos pela eutanásia e retirada das estruturas. Para a execução do estudo os 18 animais foram divididos da seguinte maneira:

- **Grupo 1:** Administração de PTEe 20mg/kg = 6 animais;
- **Grupo 2:** Administração de PTEe-NPMs 20mg/kg = 6 animais;
- **Grupo 3:** Administração de PBS = 6 animais.

3.3 MATERIAIS

O monômero renovável e as NPs de PTEe foram preparados com ácido 10-undecenóico (Sigma-Aldrich, 98%), 1,3-propanodiol (Sigma-Aldrich, 99,6%), ácido p-toluenossulfônico mono-hidratado (Sigma-Aldrich, 98,5%), dodecilsulfato de sódio (SDS, Vetec), azobisisobutironitrila (AIBN, Vetec, 98%) e 1,4-butanoditol (Sigma-Aldrich, > 97%). A síntese das NPs magnéticas (NPMs) envolveu os seguintes reagentes: sulfato ferroso ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de amônio (99%) e ácido oleico (OA), todos adquiridos da Vetec. A encapsulação das NPMs foi feita utilizando: dodecilsulfato de sódio (SDS). Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), adquiridos da Vetec, foram utilizados como tensoativos e tampões, respectivamente. Lecitina (Alpha Aesar) e diclorometano (DCM, Panreac, 99,8%) foram usados como solvente. Água destilada foi usada ao longo dos experimentos (Mattos dos Santos et al., 2018).

3.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese do monômero renovável, 1,3-propileno diundec-10-enoato e PTEe via polimerização em miniemulsão de tiol-eno foi a mesma descrita por Cardoso et al. (2017). As amostras de PTEe foram liofilizadas para uso posterior.

Ácido 10-undecenóico (50,0g,0,27mol), 1,3-propanodiol (8,4g,0,11mol), ácido p-toluenossulfônico (3g,0,0157mol) e tolueno (200mL) foram adicionados a um frasco de fundo redondo equipado com um agitador magnético e um aparelho Dean-Stark. A mistura resultante foi aquecida a refluxo e a água foi recolhida à medida que a reação prosseguia. Uma vez completa a reação, foi esperado que a mistura resfriasse. Depois de remover o tolueno sob pressão reduzida, o resíduo foi filtrado através de uma pequena almofada de óxido de alumínio básico com hexano como eluente. O hexano foi removido e o produto bruto foi dissolvido em éter dietílico (200mL) e lavado duas vezes com água (200mL). A fração orgânica foi seca sobre MgSO_4 anidro e o solvente removido sob pressão reduzida.

Para as reações de miniemulsão, a fase aquosa foi preparada misturando água (10 mL) e 0,019 wt. % de SDS como surfactante. A mistura foi deixada em agitação até a solubilização completa do surfactante. A fase orgânica foi

preparada misturando o monômero α , ω -dieno (1,0g) e 1 mol% do iniciador orgânico solúvel AIBN (em relação ao BDT) sob agitação magnética até a solubilização completa do iniciador. A fase aquosa foi adicionada à fase orgânica e, após 10 min de agitação magnética vigorosa (500rpm), foi obtida uma macroemulsão. Em seguida, 0,29 mL de BDT foram adicionados ao sistema (razão molar de 1:1 ditiol-dieno) com uma micropipeta e a mistura foi deixada sob agitação magnética moderada (250 rpm) por 5 minutos. A emulsão final foi sonicada por 2 minutos (10 s ligada, 2 s desligada) com amplitude de 60%, usando um desmembrador Fisher Scientific Sonic modelo 500 e ponta de 1/2". Um banho de gelo foi usado para reduzir o aumento da temperatura durante a sonicação.

As NPMs revestidas com ácido oleico (NPMs-AO) foram preparados de acordo com o método utilizado por Feuser et al. (Feuser et al., 2015). Os NPMs foram sintetizados pelo método de coprecipitação em meio aquoso. Primeiramente, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ClFe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram solubilizados em água destilada na proporção molar de 1: 1. Posteriormente, foi adicionado NH_4OH controlando o pH inicial (1) e final (10) da reação, em temperatura ambiente e velocidade de agitação de 700 rpm. Na segunda etapa, OA foi adicionado para estabilizar os NPMs. Após a estabilização, o material foi lavado com acetona para remover o excesso de AO e a seguir a amostra foi centrifugada e lavada várias vezes até que o excesso de AO fosse completamente removido.

3.4.1 Preparação de nanopartículas de poli (tioéter-éster) superparamagnético (PTEe-NPMs)

O encapsulamento dos NPMs nas NPs de PTEe foi realizado pelo método de miniemulsão e evaporação do solvente. A fase aquosa foi preparada misturando água (7g) e o surfactante SDS (0,5% em peso) e a mistura foi deixada em agitação até a solubilização completa do surfactante. A fase orgânica foi preparada misturando PTEe pré-formado (40 mg), lecitina como surfactante (15 mg) e diclorometano como solvente (0,6 g), mais 0,6 g de DCM com 15 mg de NPMs contendo aproximadamente 27% de A). A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa no início da etapa de sonicação. A sonicação ocorreu por 3 minutos (20 segundos ligada, 10 segundos desligada) com amplitude de 70% (Fisher Scientific

Sonic Dismembrator modelo 500 e uma ponta de 1/2”). Um banho de gelo foi usado para reduzir o aumento da temperatura durante a sonicação. A miniemulsão foi deixada em banho termostático com temperatura de 60 °C até completa evaporação do solvente.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA

O tamanho da partícula, o índice de polidispersão e a carga superficial das NPs foram medidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando um analisador Malvern Zetasizer Nano ZS. A carga superficial foi investigada por meio de medições de potencial zeta. Para ambas as análises, todas as amostras foram analisadas três vezes à temperatura ambiente (25°C), a partir da qual foram calculados a média e o desvio padrão. A caracterização da morfologia das partículas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão usando um JEM-1011 TEM (100 kV). Para esta análise, a amostra foi diluída em água destilada até 0,01% do teor de sólidos e uma única gota foi colocada em uma grade de cobre revestida com carbono. Em seguida, a grade foi seca em condições ambiente durante a noite (Mattos dos Santos et al., 2018).

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Hiperalgisia mecânica – teste de von Frey

Para avaliar a sensibilidade mecânica dos camundongos, filamentos de von Frey foram usados seguindo o método up-down (Dixon, 1980). Após a aclimação (0,5 hora) em caixas individuais de Plexiglas transparente com piso de tela de arame (9 a 7 x 11 cm), os filamentos de von Frey de rigidez crescente (0,02–10 g) foram aplicados às superfícies plantares da pata traseira dos camundongos por não mais que 3 segundos com pressão suficiente para dobrar o filamento. Na ausência de resposta (elevação da pata), um filamento mais grosso era aplicado, porém, se houvesse resposta, o animal era submetido ao estímulo com um filamento mais fino. Isso foi repetido 6 vezes para filamentos diferentes ou 4 vezes quando ocorriam respostas positivas/negativas consecutivas, conforme descrito anteriormente por Dixon. O limiar mecânico foi expresso em miligramas (mg) e

avaliado antes (controle) e após as administrações das NPs de PTEe e PTEe - NPMs.

3.6.2 Teste de campo aberto (Open Field)

Para avaliar a atividade locomotora espontânea e comportamento exploratório dos animais após o tratamento com as NPs, o teste de campo aberto foi realizado conforme descrito por Seibenhener e Wooten (2015) . Os camundongos foram introduzidos em câmaras de atividades individuais (50x50x25 cm), às quais não foram previamente expostos. Cada câmara tinha uma zona interna (20x20 cm) delimitando o centro da câmara. As atividades espontâneas foram consideradas como o tempo gasto na zona central, o número de cruzamentos (movimentos horizontais), a latência para entrar no quadrado central e o número de levantadas (movimentos verticais) foram analisados por 5 minutos (Seibenhener; Wooten, 2015).

3.6.3 Teste da acetona

A alodinia ao frio foi avaliada pela medição da resposta nociceptiva aguda ao resfriamento evaporativo evocado por acetona (De prá et al., 2019). Com os camundongos em pé sobre um piso de tela de arame e confinados à câmara de acrílico, uma gota (20µl) de acetona foi colocada na pele do calcanhar da pata traseira dos camundongos. As respostas comportamentais, como lambar e levantar (tempo de nocicepção, em s), ao contato com acetona foram cronometradas por 1 minuto.

3.6.4 Teste de retirada da cauda (Tail Flick)

O teste de imersão da cauda em água quente (retirada da cauda) foi conduzido para avaliar a latência à retirada da cauda. As caudas dos camundongos foram imersas em água a 48 ° C aquecida em banho-maria. A latência para retirada da cauda foi medida antes e 0,5, 1, 2 e 4 horas após a administração das NPs de PTEe e PTEe - NPMs, com tempo de corte de 18 segundos. A latência foi medida uma vez para cada animal em cada ponto de tempo, e a média foi registrada (Shen et al., 2018).

3.6.5 Teste de Rotarod

Os camundongos foram estimulados a caminhar ao redor de uma superfície circular de tambor, ao qual foram previamente expostos um dia antes para treinamento (programado a 8 rpm, até permanecerem sem cair por 60 segundos). No dia do teste, os camundongos foram expostos ao equipamento por 180 segundos, depois foi observada a latência para a primeira queda e o número de quedas subsequentes. O teste de rotarod avalia o equilíbrio, coordenação motora e performance física através do cálculo do número de quedas em determinada velocidade (Martins et al., 2019).

3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.7.1 Preparação das amostras para análises bioquímicas

A região central do gastrocnêmio, fígado, pulmão, rim e tecido cardíaco dos animais bem como as áreas encefálicas foram removidas cirurgicamente, processadas e armazenadas em um freezer a -80°C para posterior análise bioquímica. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (PBS) e centrifugadas a $1000\times g$, 4°C e o sobrenadante foi mantido a -80°C até posterior teste. O período máximo de armazenamento entre a preparação do homogenato e a análise bioquímica foi inferior a 5 dias.

3.7.2 Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico

Os níveis intracelulares oxidados de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) foram monitorados em amostras incubadas com 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). A formação do derivado fluorescente oxidado foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência da SpectraMax. Os níveis de óxido nítrico foram estimados espectrofotometricamente a partir da produção de nitrito. As amostras foram incubadas com o reagente de Griess à temperatura ambiente durante 20 minutos e a absorbância a 540 nm foi medida utilizando um leitor de microplacas (Song et al., 2010).

3.7.3 Determinação dos marcadores de dano oxidativo

O conteúdo de derivados da proteína carbonil foi avaliado medindo os níveis de derivados da proteína hidrazona marcados usando 2,4-dinitrofenilhidrazida. Esses derivados foram extraídos com ácido tricloroacético, tratados com etanol/acetato de etila e dissolvidos em cloridrato de uréia. A concentração de 2,4-dinitrofenilhidrazida incorporada foi expressa em nmol por miligrama de proteína e calculada com base na absorvância a 370 nm. O conteúdo total de tiol foi determinado usando a incorporação de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) e a absorvância foi medida a 412 nm usando um espectrofotômetro (Levine et al., 1990).

3.7.4 Determinação de defesas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi testada avaliando a inibição da autoxidação da adrenalina medindo a absorvância a 480 nm, conforme descrito por Bannister e Calabrese. Os resultados foram expressos em U SOD / mg de proteína. A atividade da catalase (CAT) foi calculada com base na taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio determinada medindo as alterações de absorvância a 240 nm. Os níveis de glutathiona total (GSH) foram determinados em homogenatos de tecido na presença de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). O desenvolvimento da cor resultante das reações de DTNB foi expresso em μmol por mg de proteína com base na absorvância a 412 nm (Bannister; Calabrese, 1987).

3.7.5 Conteúdo de proteínas

O conteúdo de proteína do tecido muscular homogeneizado foi medido seguindo o protocolo de Lowry usando albumina de soro bovino como padrão. O reagente fosfotúngstico fosfomolibdico (Folin fenol) foi adicionado às amostras e então ligado à proteína presente, fazendo com que a cor do reagente mudasse de amarelo para azul. A absorvância foi então medida a 750 nm. Fosfotúngstico fosfomolibdico (Folin fenol) foi adicionado às amostras e então ligado à proteína presente, fazendo com que a cor do reagente mudasse de amarelo para azul. A absorvância foi então medida a 750 nm (Lowry; Randall, 1951).

3.8 ANÁLISE DE HPLC-FD DO CONTEÚDO DE DOPAMINA

Os níveis de dopamina foram determinados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (De Benedetto et al., 2014). Após a extração dos tecidos, a medula espinhal, o córtex, o hipocampo e o corpo estriado dos camundongos foram armazenados a -80°C até a análise. As amostras foram homogeneizadas em 400 μL de ácido perclórico 0,2M e centrifugadas (12.000xg por 10min a 4°C), após a centrifugação, os sobrenadantes coletados foram deixados em banho de gelo por 5 min e posteriormente analisados por HPLC de detecção fluorométrica. Para as análises foi utilizado um sistema HPLC equipado com bomba LC-20AT acoplada a um amostrador automático SIL-20AHT e detector de fluorescência RF-20A, e o software LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japão). A fase móvel consistia em tampão acetato (ácido acético 12 mM: EDTA 0,26 mM (50:50, v / v) pH 3,5) e metanol grau

HPLC (86:14, v / v) com perfil isocrático. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min. Como fase estacionária foi aplicada uma coluna de cromatografia analítica Ascentis® C18 (250 mm \times 2,1 mm, 5 μm ; Supelco®, Bellefonte, PA, EUA) com temperatura de 35°C . O volume de injeção das amostras foi de 20 μL . A fluorescência foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 279 e 320 nm, respectivamente. O pico de dopamina foi identificado comparando o seu tempo de retenção mostrado nas soluções padrão com a solução da amostra (extrato de tecido). Na sequência, os resultados foram quantificados por comparação com a área do pico das soluções padrão de uma curva de calibração ($r^2 \geq 0,99$). Os resultados foram expressos como dopamina ng/mg de tecido.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o software Graph Pad Prism versão 5.01. Os dados foram analisados por meio de análises de variância (ANOVA) de um ou dois fatores, seguidas de testes Post-hoc de Bonferroni ou T Student, quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Como citado anteriormente, as NPs de PTEe foram sintetizadas de um monômero renovável via polimerização por miniemulsão de tiol-eno, enquanto o passo de incorporação de NPMs foi obtida pela técnica de miniemulsão de evaporação de solvente e as propriedades fisicoquímicas foram avaliadas. Ambas as NPs apresentaram tamanho nanométrico e potencial zeta altamente negativo (Tabela 1). As NPs PTEe-NPMs apresentaram um potencial zeta menor do que as NPs PTEe.

Tabela 1. Diâmetro médio de intensidade das NPs (DP), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta.

Amostras	DP (nm)*	Pdl	Potencial Zeta (mv)
PTEe	119 ± 4	> 0.2	- 31 ± 4
PTEe-NPMs	127 ± 4	> 0.2	- 40 ± 5

* o desvio padrão médio foi calculado a partir de 3 medidas. Fonte: Elaboração da autora.

A figura 1 representa as imagens TEM das NPs PTEe (figuras 1A e 1C) and PTEe-NPMs (figuras 1B e 1D). Como se pode observar nas figuras 1A, 1B, e 1D, ambas as NPs apresentaram morfologia esférica e tamanho médio de aproximadamente 120nm. Os pontos pretos são agregados dentro do PTEe – NPMs correspondentes as NPMs com o tamanho entre 5 e 20nm. É importante mencionar que as partículas de PTEe apresentam baixa temperatura de transição *in vitro* onde o feixe de elétrons emitido pelo equipamento tende a degradar as partículas (Figura 1C).

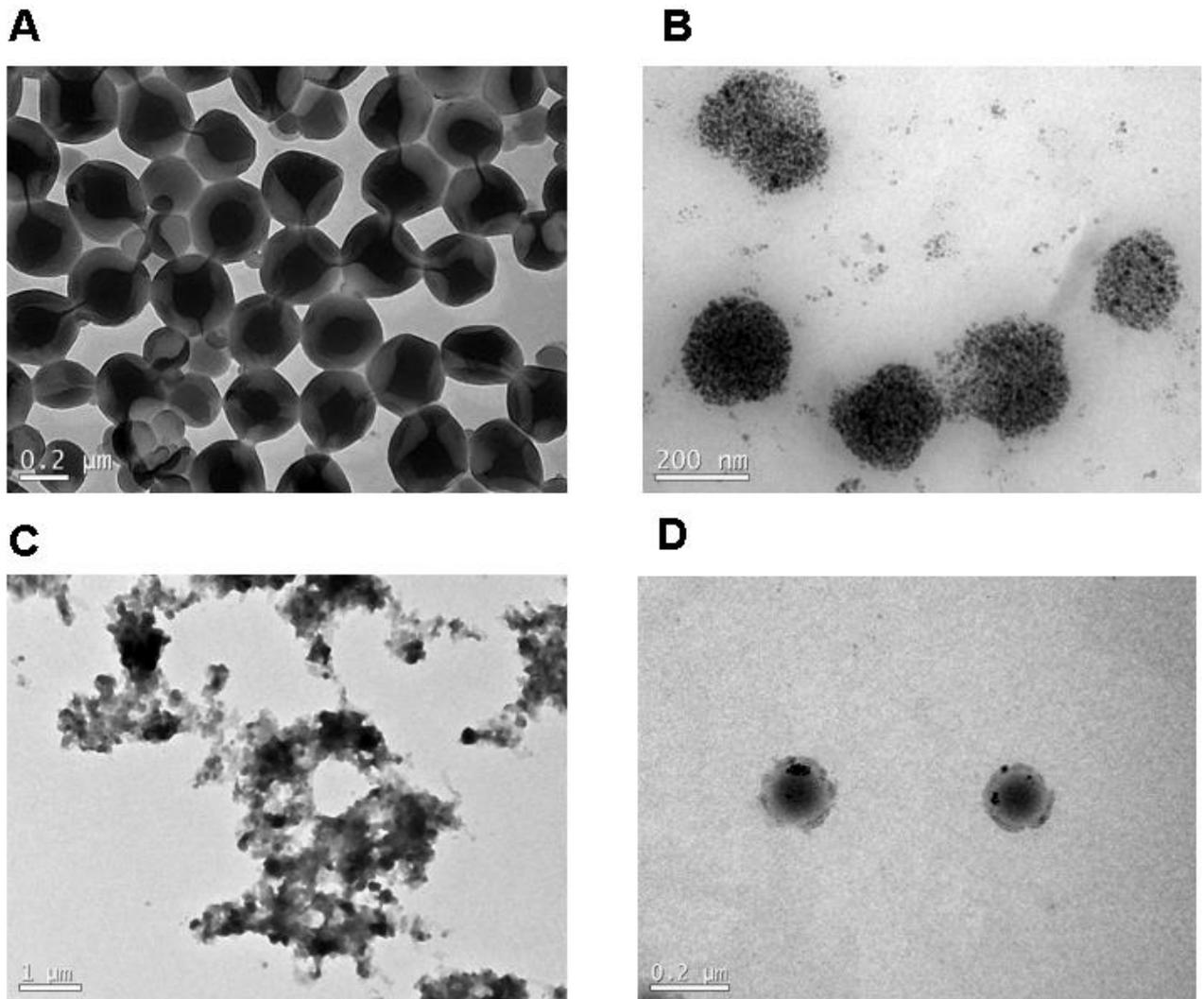


Figura 1. Caracterização das NPs: Imagens TEM das NPs de PTEe (A e C) e NPs PTEe-NPMs (B e D).

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os estudos comportamentais foram realizados nos camundongos para avaliar a capacidade das NPs PTEe e PTEe-NPMs de provocar dor ou alterar comportamentos relevantes, quando administradas por via IP na concentração de 20mg/kg. O teste de Von Frey foi utilizado para avaliar a sensibilidade dolorosa a um estímulo mecânico (figura 2A), o teste de alodínia ao frio para avaliar a sensibilidade exacerbada ao frio (figura 2B) e o teste de retirada da cauda para avaliar a sensibilidade ao calor (figura 2C). Em nenhum dos testes foi observada diferença significativa entre os grupos, conforme o gráfico a seguir:

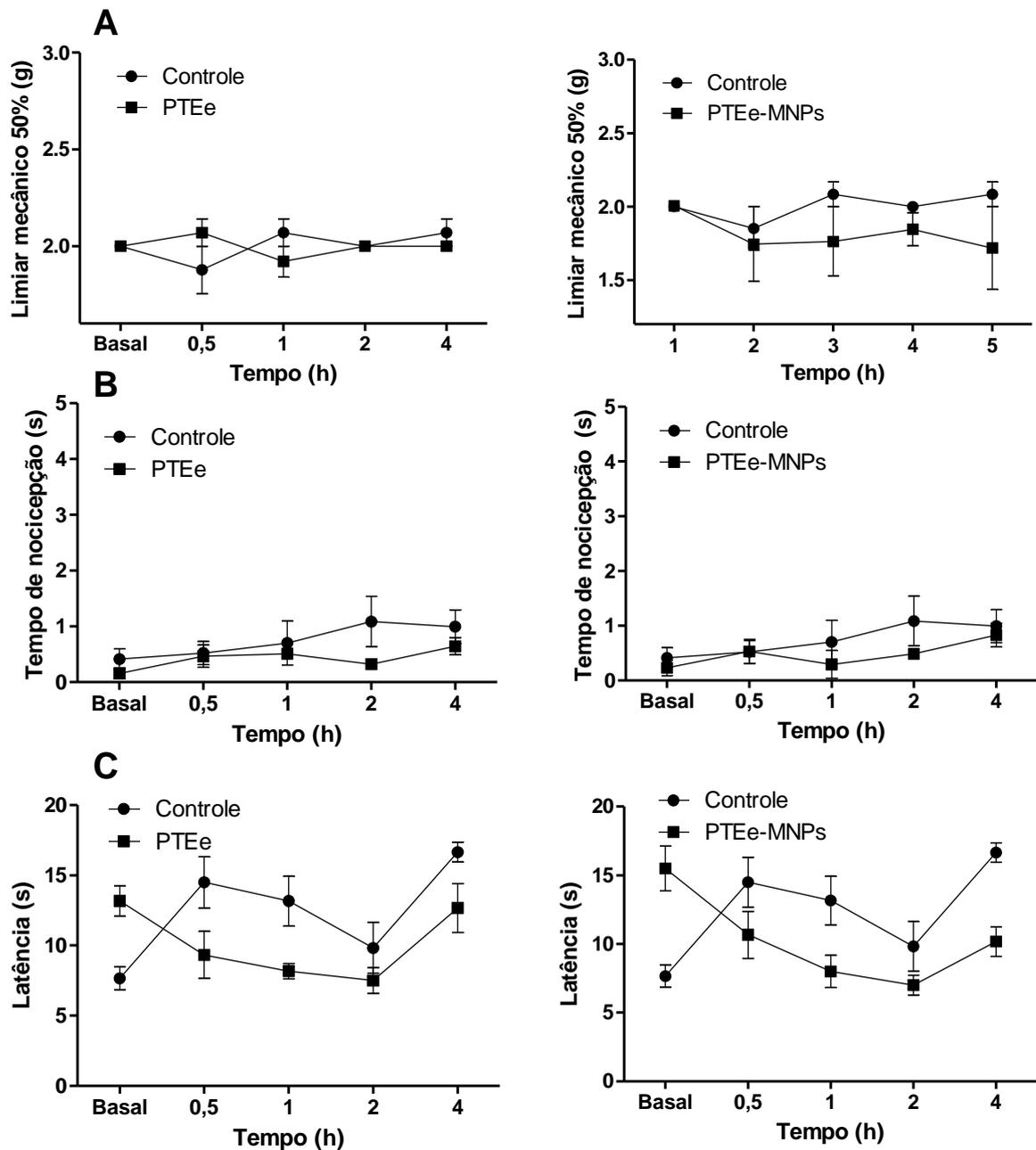


Figura 2. Limiar de nociceção - Decurso temporal dos efeitos do PTEe IP, 20mg/kg. Os resultados são expressos como (A) limiar mecânico (Log mg) medido com filamentos de von Frey, (B) alodinia ao frio no teste da acetona (C) latência para retirada da cauda. Cada ponto e linha vertical representa a média e os valores de desvio padrão.

O teste de rotarod (figura 3) foi utilizado para verificar o desempenho motor e o equilíbrio avaliados pela locomoção forçada através do tempo decorrido até a primeira queda (figura 3A) e número de quedas subsequentes (figura 3B). Os resultados mostram que não foram observadas alterações comportamentais nos

camundongos após a administração aguda de NPs quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$).

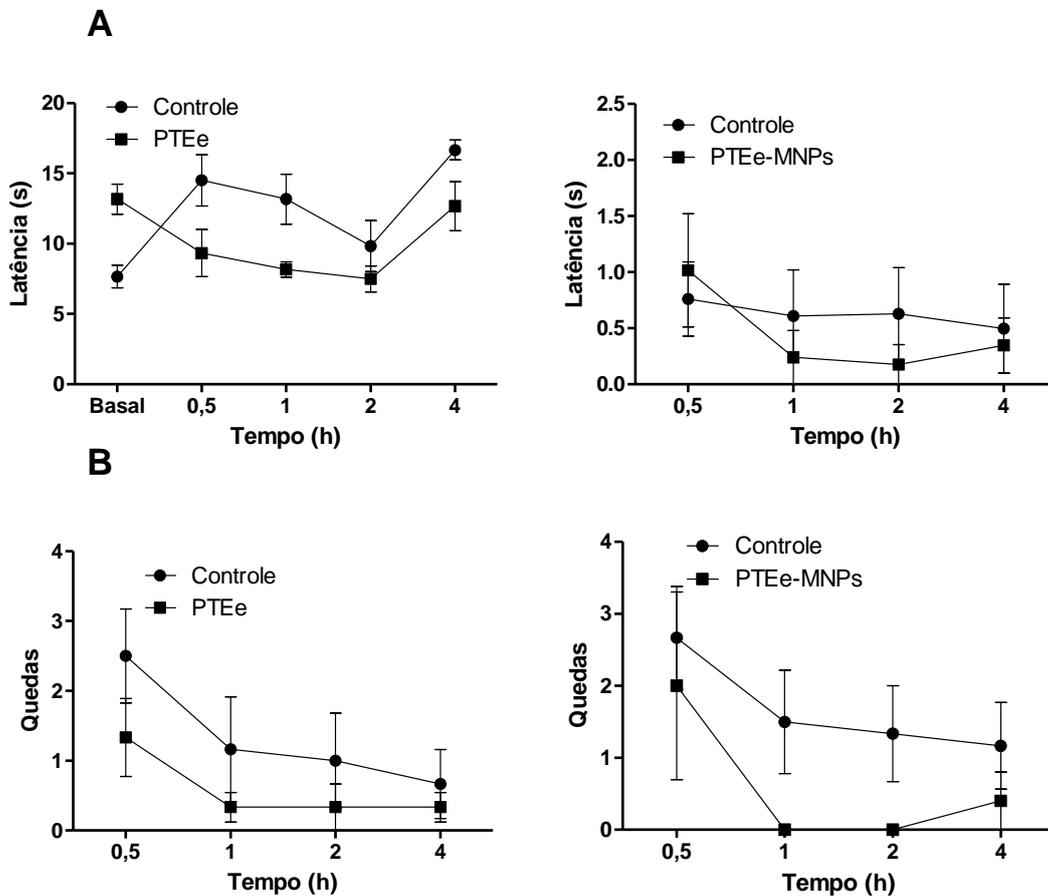


Figura 3. Desempenho motor na locomoção forçada: Decurso temporal do efeito das NPs de PTEe e PTEe-NPMs após administração IP. Os resultados são expressos como (A) latência para a primeira queda e (B) número de quedas no teste de rotarod. Cada ponto e linha vertical representa a média e os valores SEM. Não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo de tratamento, de acordo com a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

A figura 4 representa os resultados observados no teste de campo aberto. O teste foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais através do número de vezes que o animal levantou (figura 4B), o número de vezes que ele cruzou o campo (figura 4A) e o número de vezes que o animal entrou no quadrado central (figura 4C). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados.

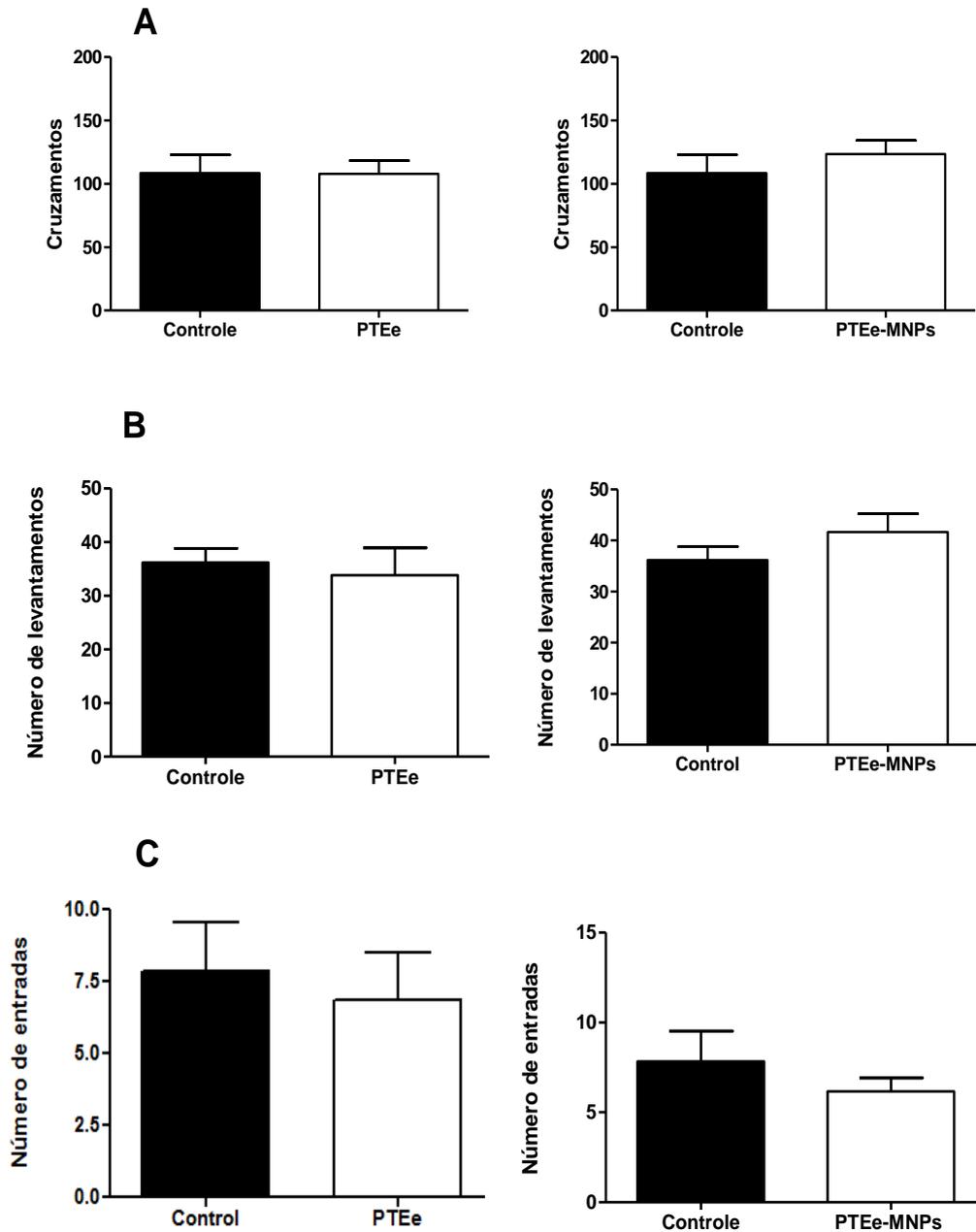


Figura 4. Função motora: Efeitos produzidos por uma injeção IP de PTEe 20mg/kg na função motora de camundongos. (A) número de cruzamentos; (B) levantadas e (C) número de entradas no quadrado central no teste de campo aberto. Cada barra representa a média e SEM. Nenhuma diferença significativa foi observada de acordo com a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

4.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os parâmetros bioquímicos das NPs PTEe e PTEe-NPMs foram avaliadas em cinco diferentes órgãos (fígado, rins, pulmão, gastrocnêmio e coração)

analisando seis parâmetros bioquímicos diferentes (DCFH, nitrito, carbonil, sulfidril, GSH e SOD). Os resultados serão expressos a seguir, ordenados por tecido.

Os níveis de DCFH e nitrito foram usados como parâmetros oxidativos. Como pode ser observado na Figura 5A, os níveis de DCFH nas duas NPs não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle no tecido hepático. Por outro lado, o nível de nitrito das duas NPs foi significativamente maior em comparação com o grupo controle. O dano oxidativo foi examinado através da quantificação de carbonil e conteúdo de sulfidril. Como mostrado na Figura 5B, a PTEe-NPMs apresentou uma diminuição significativa nos níveis de carbonil e sulfidril, enquanto a PTEe apresentou uma diminuição significativa apenas nos níveis de sulfidril em comparação com o grupo controle.

Os níveis de SOD e GSH foram utilizados como parâmetro de enzimas antioxidantes. Os resultados de SOD e GSH de ambas N PTEe e PTEe-NPMs apresentaram uma redução significativa quando comparado com o grupo controle (Figura 5C). A redução foi mais pronunciada nos níveis de GSH.

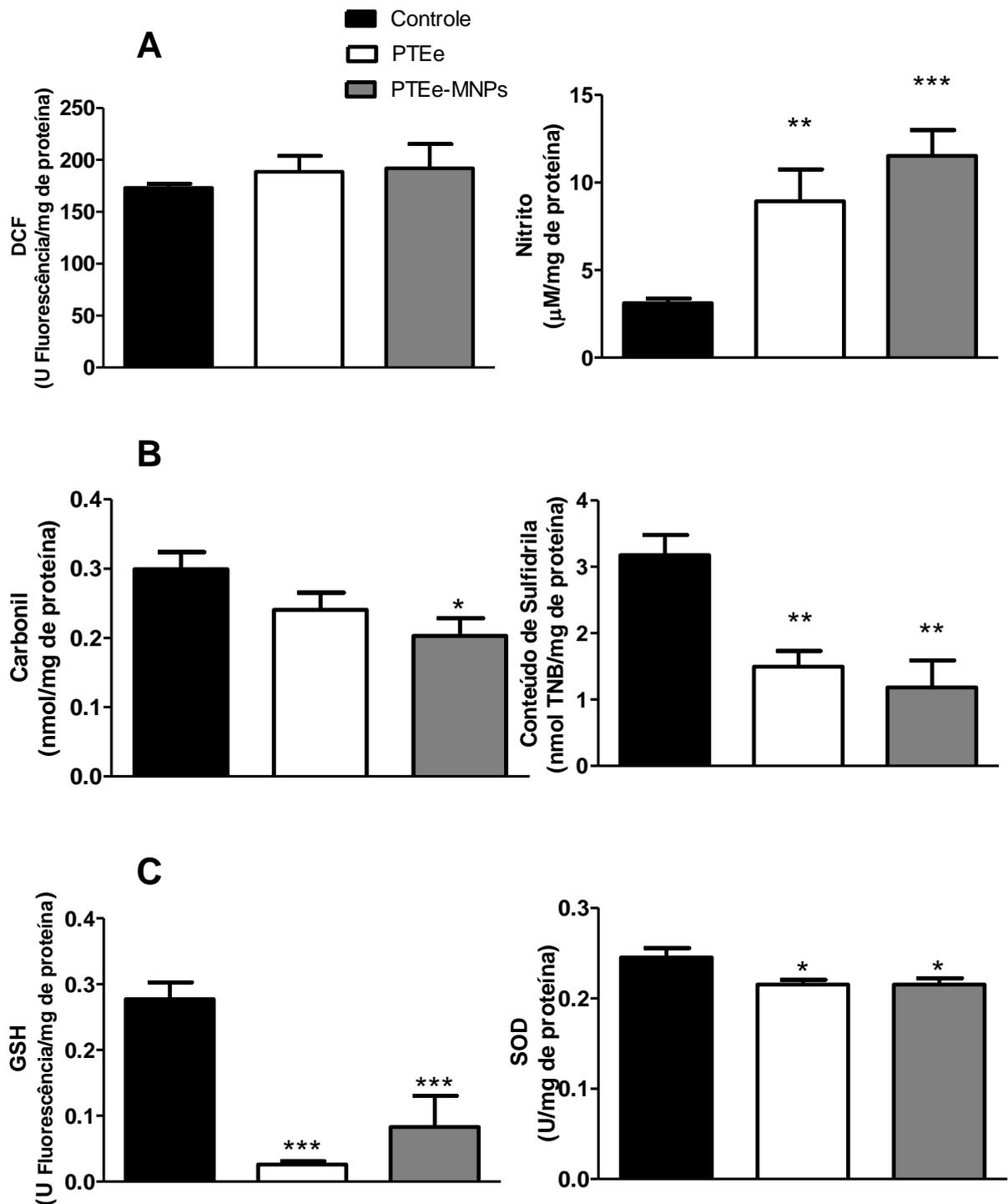


Figura 5. Fígado: Análise bioquímica dos níveis de (A) DCFH e nitrito, (B) Carbonil e conteúdo de sulfidril e (C) atividade de GSH e SOD, após administração das NPs PTEe e PTEe-NPMs na concentração de 20mg/kg após administração IP em camundongos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Já nos rins, como mostrado, ambas NPs não mostraram diferença significativa nos níveis de DCFH e nitrito conforme a figura 6A. As NPs PTEe-NPMs

reduziram os conteúdos de carbonil e sulfidril a em comparação com as NPs PTEe (Figura 6B). Os níveis de GSH e SOD nos rins apresentaram uma redução significativa quando comparados com o grupo controle (Figura 6C).

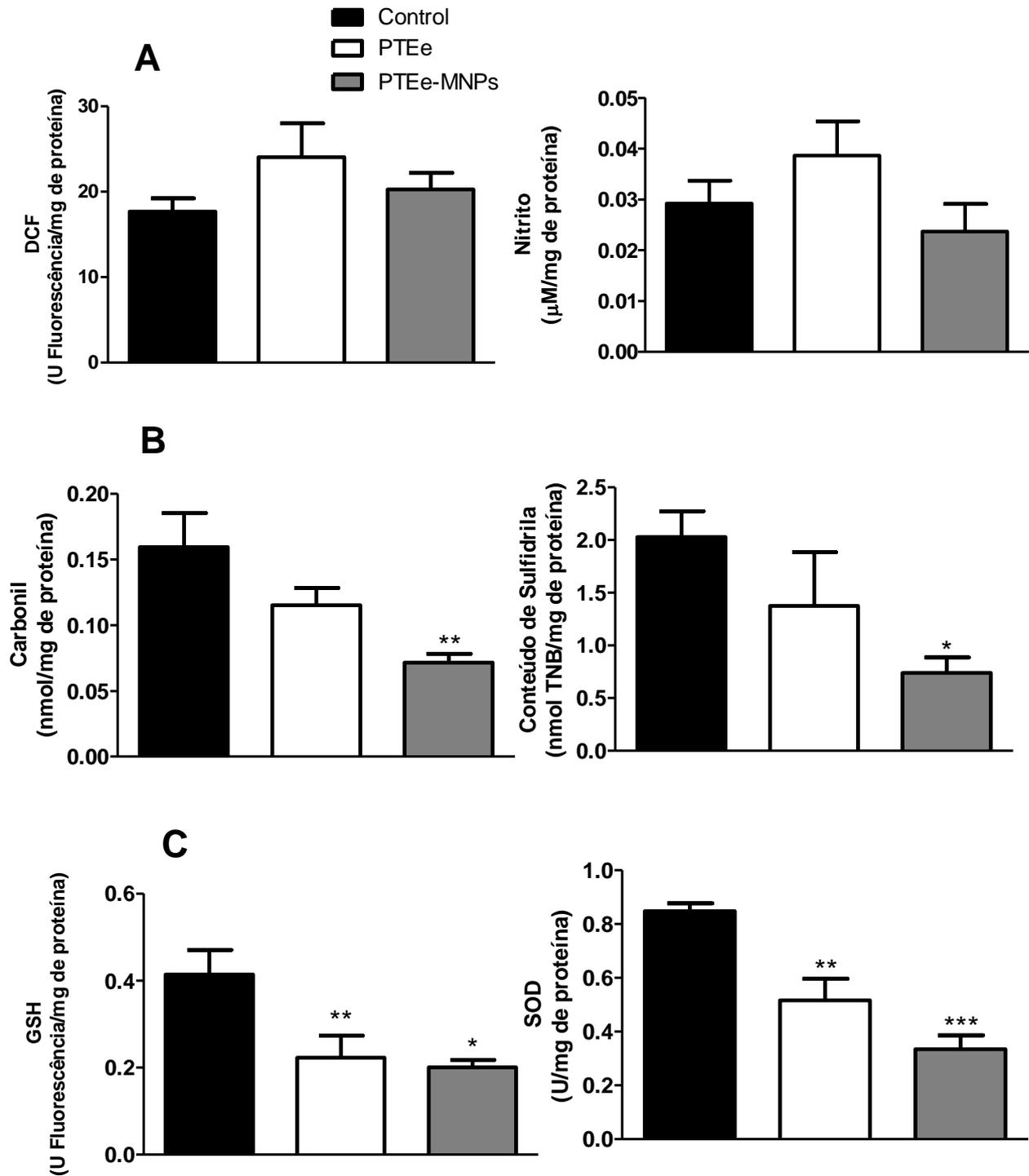


Figura 6. Rins: Análise bioquímica dos níveis de (A) DCFH e nitrito, (B) Carbonil e conteúdo de sulfidril a e (C) atividade de GSH e SOD, após administração das NPs PTEe e PTEe-NPMs na concentração de 20mg/kg após administração IP em camundongos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$

quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

No pulmão, os níveis de DCFH e nitrito (Figura 7A), assim como os níveis de carbonil e sulfidril (Figura 7B) não foram afetados pela administração das NPs. Em contraste, foi observada uma redução significativa nas enzimas antioxidantes (Figura 7C).

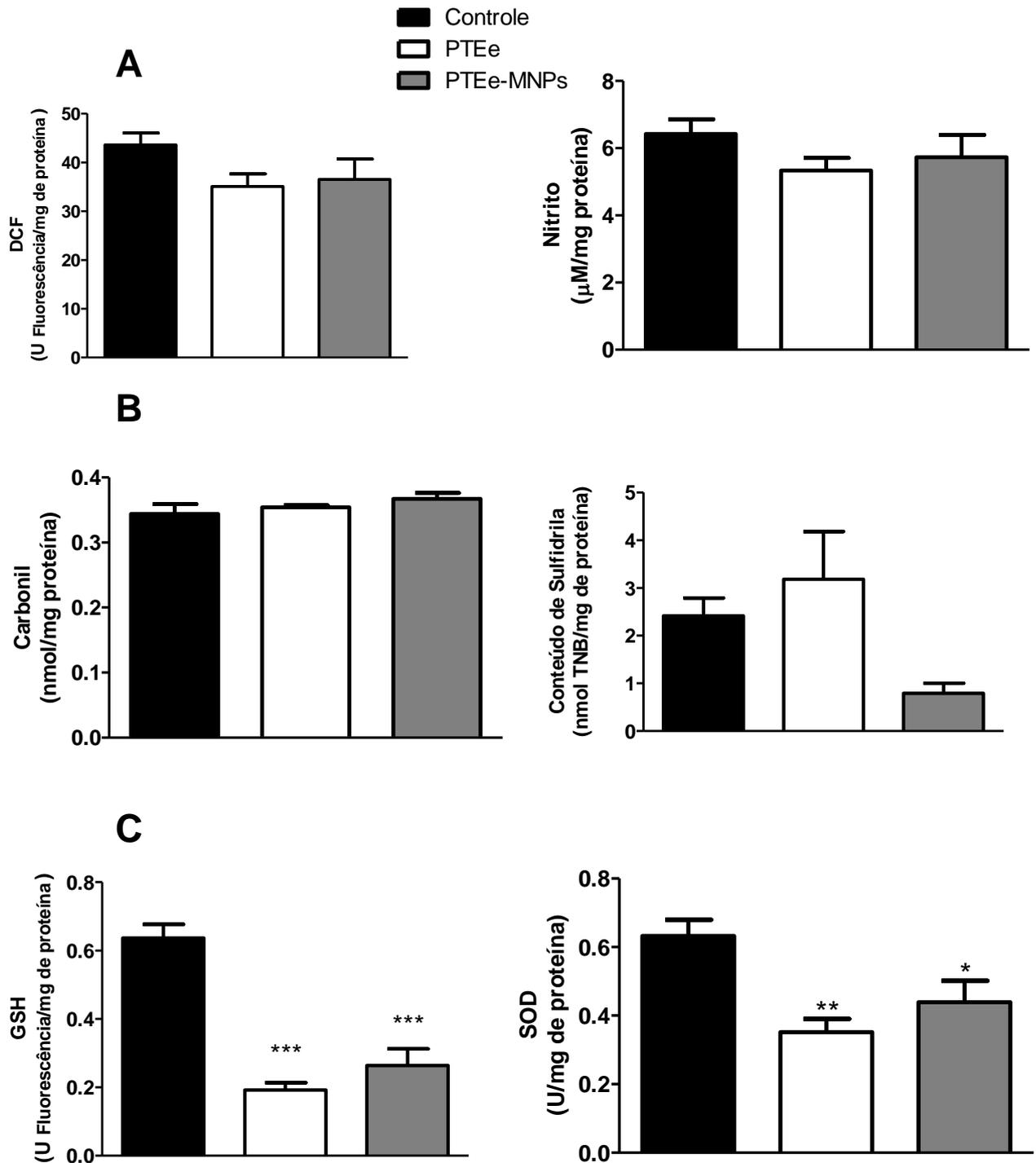


Figura 7. Pulmão: Análise bioquímica dos níveis de (A) DCFH e nitrito, (B) Carbonil e conteúdo de sulfidril e (C) atividade de GSH e SOD, após administração das NPs PTEe e PTEe-NPMs na concentração de 20mg/kg após administração IP em camundongos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

A figura 8 representa os resultados observados no músculo gastrocnêmio. A PTEe apresentou níveis significativamente reduzidos de DCFH em comparação com o grupo controle e o grupo PTEe-NPMs. Em contraste, PTEe-NPMs não apresentou diferenças significativas nos níveis de DCFH. Os níveis de nitrito não foram afetados (Figura 8A). Pela análise das proteínas, pode ser observada uma diminuição significativa no conteúdo de sulfidril (Figura 8B). Além disso, as enzimas antioxidantes também foram afetadas após administração IP, mostrando uma diminuição em relação ao controle, em ambas as NPs (Figura 8C).

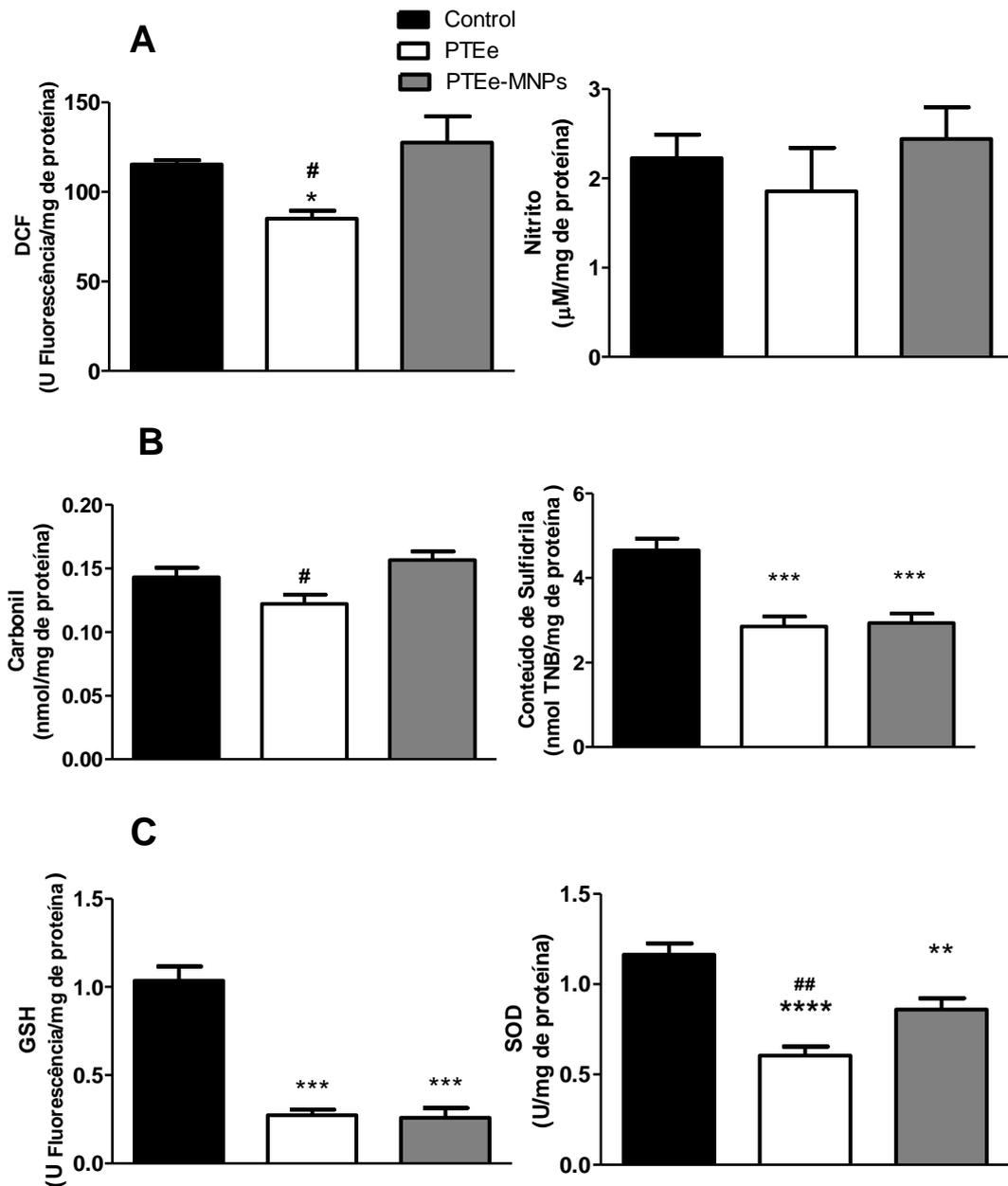


Figura 8. Gastrocnêmio: Análise bioquímica dos níveis de (A) DCFH e nitrito, (B) Carbonil e conteúdo de sulfidril e (C) atividade de GSH e SOD, após administração das NPs PTEe e PTEe-MNPs na concentração de 20mg/kg após administração IP em camundongos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle e # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ em comparação com o grupo PTEe-MNPs, de acordo com o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

No coração, os níveis de DCFH também foram afetados pela administração IP das NPs de PTEe. Em contraste, os níveis de nitrito aumentaram significativamente (Figura 9A). Os outros parâmetros analisados, como proteínas e enzimas antioxidantes não foram afetadas após administração IP das NPs no tecido cardíaco (Figuras 9B e 9C).

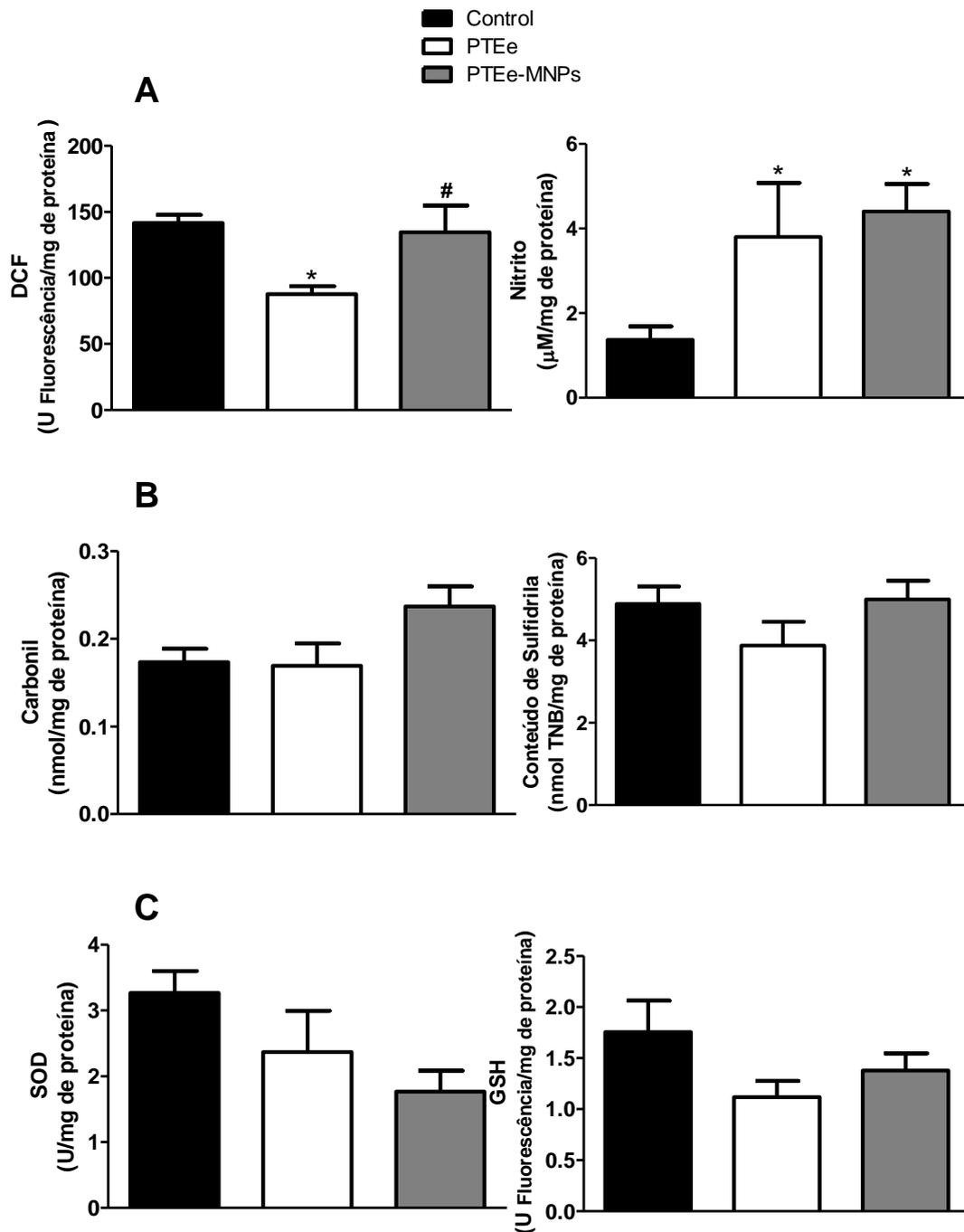


Figura 9. Coração: Análise bioquímica dos níveis de (A) DCFH e nitrito, (B) Carbonil e conteúdo de sulfidril e (C) atividade de GSH e SOD, após administração das NPs PTEe e PTEe-NPMs na concentração de 20mg/kg após administração IP em camundongos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle e # $p < 0.05$ em comparação com o grupo PTEe, de acordo com o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

4.4 CONTEÚDO DE DOPAMINA

O conteúdo de dopamina foi avaliado em diferentes estruturas cerebrais. Ambos os grupos analisados PTE e PTE-NPMs, não apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo controle na estrutura do córtex, hipocampo e medula espinhal. No entanto, no estriado, o conteúdo de dopamina apresentou uma diminuição significativa em ambos os grupos analisados em comparação com o grupo controle, conforme os gráficos apresentados na figura 10.

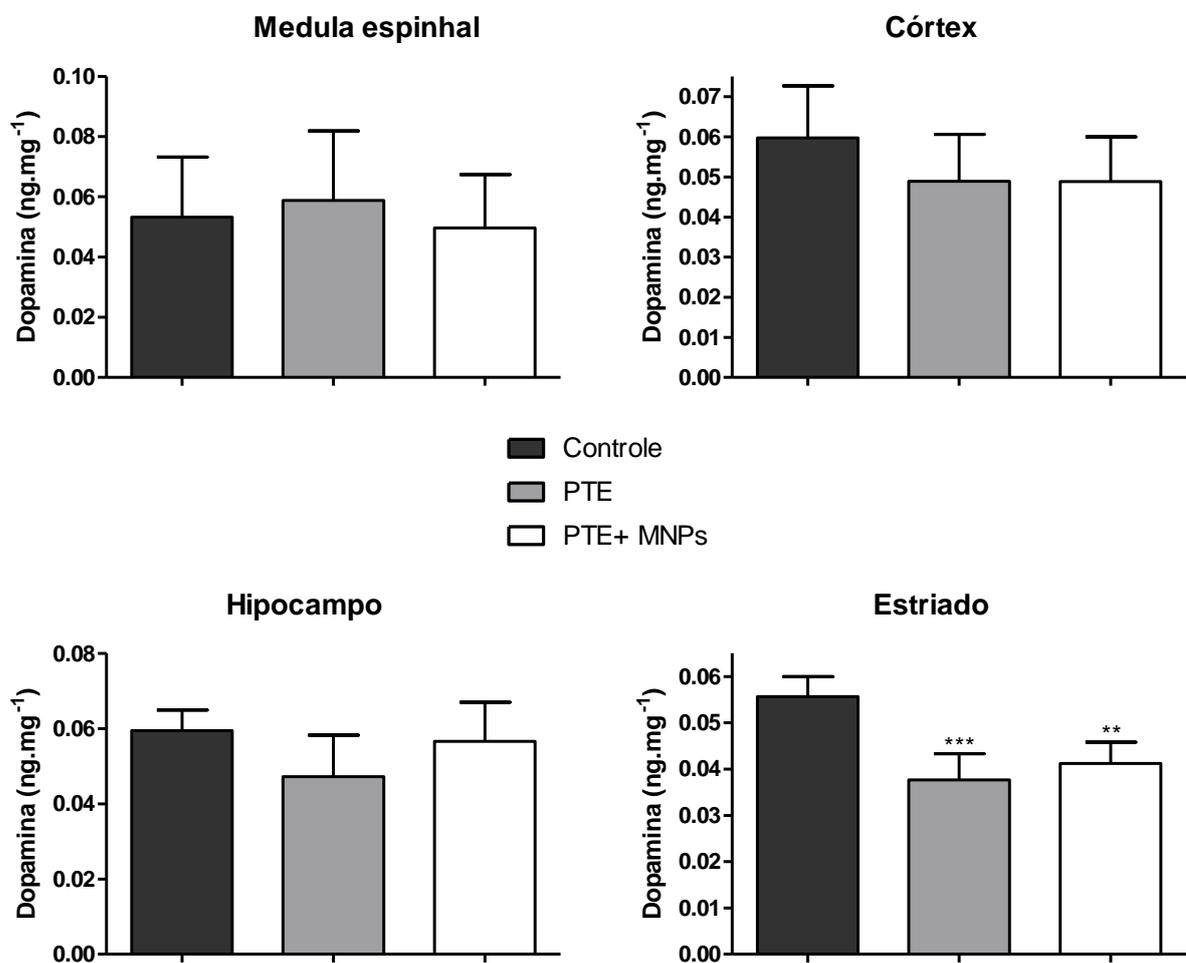


Figura 10. Conteúdo de dopamina: Avaliação do conteúdo de dopamina por HPLC-FD em diferentes tecidos (medula espinhal, córtex, hipocampo e estriado) após administração de PTEe and PTEe-NPMs 20mg/kg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle, de acordo com o teste de ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

A nanomedicina é uma ciência relativamente nova, mas em rápido desenvolvimento, onde os materiais na faixa de nanoescala são empregados como recurso de diagnóstico ou para entrega de substâncias em sítios específicos e de maneira controlada. Estudos sobre os diferentes métodos de síntese, análise das características das NPs e a exploração de novas áreas de aplicação, pontuam a evolução desta ferramenta. A possibilidade de produção de NPs hidrofílicas pavimentou o caminho para seu uso em diversas pesquisas biomédicas básicas e aplicadas (Su et al., 2008; Iqbal et al., 2012).

A nanotecnologia oferece benefícios no tratamento de doenças humanas crônicas por direcionamento específico ao sítio de ação dos medicamentos, permitindo assim o controle de parâmetros importantes como taxa de absorção e toxicidade. Atualmente as NPs também são aplicadas no diagnóstico por imagem através de diferentes marcadores moleculares de doenças genéticas e autoimunes, tumores malignos e outros transtornos. No entanto, a toxicidade das NPs para organismos vivos é um fator limitante que dificulta seu uso *in vivo* (Sukhanova et al., 2018).

Os polímeros têm desempenhado um papel fundamental no avanço da tecnologia de entrega de drogas por fornecer liberação controlada de agentes terapêuticos em doses constantes e, por um longo período, estão entre os excipientes mais utilizados na tecnologia farmacêutica. Porém, as propriedades deste material em escala nanométrica têm sido exploradas apenas nas últimas décadas. O pequeno tamanho das NPs permite que elas atravessem o epitélio e endotélio, podendo chegar a circulação e atingir diferentes órgãos e tecidos (Oberdörster et al., 2005; Dukhin; Labib, 2013;).

Considerando então que materiais de mesma natureza podem apresentar comportamentos distintos dependendo das dimensões em que foram sintetizados, estudos atuais sobre os efeitos tóxicos de NPs para identificar os alvos e mecanismos de seus efeitos nocivos, bem como estudos sobre padrões de transporte, acúmulo e metabolismo, são realizados em modelos de cultura de células e em modelos animais. Nesta perspectiva, foi objetivo deste trabalho avaliar a biocompatibilidade de NPs poliméricas de PTEe e PTEe superparamagnéticas em camundongos, de acordo com os critérios citados.

Uma vez que a biocompatibilidade destas NPs é determinada por não apresentarem toxicidade, antes de compreender o comportamento *in vivo* das NPs é importante conhecer as suas propriedades fisicoquímicas (Sharifi et al., 2012; Honary; Zahir, 2013; Spirou et al., 2018). Assim, ambas as NPs testadas apresentaram tamanho <127nm, sendo que as NP de PTEe apresentaram tamanho menor (119 ± 4). Como esperado, a incorporação das NPMs provocou um aumento nas partículas. O diâmetro das NPs deve estar entre 120 e 200 nm para evitar o extravasamento para os tecidos, a fim de maximizar a aceitação. Feuser, et al. (2020) demonstraram que as NPs obtidas por miniemulsão e evaporação de solvente possuem morfologia e diâmetro em torno de 150 nm, corroborando com os tamanhos observados neste trabalho.

O tamanho da partícula, o índice de polidispersão e a carga superficial das NPs foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e a carga superficial das NPs foi investigada por meio de medições do potencial zeta. As NPs de PTEe se degradaram quando expostas ao feixe de elétrons durante a análise TEM, sendo que a degradação foi mais intensa em tempos de exposição mais longos. Os resultados do DLS corroboram com a análise TEM, uma vez que o tamanho das partículas está no mesmo intervalo e os valores de polidispersão são inferiores a 0,2, indicando que as amostras têm uma distribuição de tamanho pouco variável e em uma faixa pequena, conforme mostrado na Tabela 1. Tanto a morfologia quanto a distribuição de tamanho de partícula têm implicações biológicas na captação celular e processos biológicos (Singh; Lillard, 2009; Elsabahy; Wooley, 2013; Sukhanova et al., 2018)

O potencial zeta é uma característica importante das NPs porque fornece informações sobre a estabilidade coloidal, bem como a captação celular e vias de fluxo (Zhang; Gao; Bao, 2015). Valores de potencial zeta de aproximadamente -40 mV em pH fisiológico indicam boa estabilidade sem formação de agregados, contribuindo para uma maior estabilidade coloidal. No entanto, pequenas diferenças de carga superficial e diferentes linhagens celulares têm implicações significativas na absorção celular de NPs (Ruenraroengsak et al., 2012). As cargas negativas nas partículas analisadas estão associadas à presença de surfactantes (dodecil sulfato de sódio) adsorvidos na superfície das NPs (Wu et al., 2010).

Como mostrado na Tabela 1, ambas as NPs apresentaram tamanho nanométrico e potencial zeta altamente negativo, promovendo força repulsiva suficiente para obter uma boa estabilidade coloidal ao sistema (He et al., 2010; JOseph; Singhvi, 2020). As NPs PTEe-NPMs apresentaram um potencial zeta menor do que as NPs PTEe. Esta diferença pode ser relacionada aos diferentes métodos de preparação e/ou com a maior concentração de surfactante absorvido na superfície da PTEe-NPMs (Feuser et al., 2016).

Estudos mostram que a alta toxicidade de NPs positivamente carregadas é explicada por sua capacidade de entrar facilmente nas células, em contraste com as NPs negativamente carregadas ou neutras. Isto ocorre devido à atração eletrostática entre as glicoproteínas da membrana celular que possuem carga negativa (Fornaguera et al., 2015; Sukhanova et al., 2018). Uma comparação dos efeitos citotóxicos de NPs de poliestireno com carga positiva x cargas negativas, em células HeLa e células NIH/3T3 mostraram que as positivamente carregadas apresentaram maior toxicidade. Isso não ocorre apenas porque NPs⁺ penetram mais efetivamente através da membrana, mas também porque elas se ligam mais fortemente ao DNA negativamente carregado, causando dano e, como resultado, prolongamento da fase G0/G1 do ciclo celular. Em contraste, NPs negativamente carregadas não têm efeito sobre o ciclo celular (Liu et al., 2011).

Além disso, as NPs positivamente carregadas têm uma facilidade para adsorção de proteínas séricas, facilitando fagocitose (De miguel; Kraychete, 2009). As proteínas adsorvidas, chamadas de coroa de proteínas, podem afetar as propriedades de superfície das NPs. Por exemplo, podem alterar a carga superficial e características de agregação. A adsorção de proteínas na superfície das NPs leva à mudanças conformacionais, que podem diminuir ou completamente inibir as atividades funcionais das proteínas adsorvidas (Fornaguera et al., 2015). a ausência de atividade destas proteínas provoca a perturbação de processos biológicos e precipitação de estruturas poliméricas ordenadas, por exemplo, fibrilas amiloide (Honary; Zahir, 2013).

As NPs geralmente são aplicadas para funções biológicas por injeção, e podem atingir os órgãos através da circulação sistêmica, e podem atingir o cérebro atravessando a barreira hematoencefálica (BHE). A BHE limita o acesso de muitos xenobióticos e substâncias que podem causar lesões no cérebro e no sistema nervoso central (SNC). Neste sentido a BHE, dificulta a terapia medicamentosa para

lesões e desordens no SNC. A aplicação da nanotecnologia no SNC como um sistema de entrega de drogas parece ser uma boa estratégia. Objetivo desta aplicação utilizando NPs com o tamanho apropriado, modificações na superfície e composição são o diagnóstico e terapia para várias doenças, especialmente em doenças neurológicas, com NPs que podem atravessar a BHE (Hu; Gao, 2010; Lima et al., 2019; Yadav; Yadav, 2020).

A dopamina é o precursor das catecolaminas, norepinefrina e epinefrina. As catecolaminas no SNC formulam a função neurotransmissora ponto a ponto e afetam processos cognitivos complexos como humor, atenção e emoção. A dopamina está especialmente envolvida em funções importantes do cérebro e alterações em neurônios dopaminérgicos podem promover desordens psiquiátricas e neurológicas como esquizofrenia, depressão e doença de parkinson (Akkermans et al., 2000; Standaert; Galanter, 2018).

A interação entre o receptor e neurotransmissor pode levar a alterações elétricas e bioquímicas na célula nervosa. Neurotransmissores são ligantes naturais de seus receptores cognatos e neste caso, a dopamina é um ligante natural de neurônios dopaminérgicos. No entanto, substâncias que atravessam a BHE podem ser ligantes não naturais e podem agir em mais receptores. Estes podem influenciar no funcionamento normal do cérebro, o que pode ser tanto terapêutico quanto neurotóxico (Akkermans et al., 2000).

Após atravessar a BHE, por qualquer via de exposição, as NPs têm a tendência de acumular em regiões específicas no cérebro, onde elas podem acessar células neurais. Kim et al. (2006), conduziram uma pesquisa com aplicações de NPMs, após quatro semanas de exposição através da via IP, os resultados mostraram a presença de NPMs no cérebro pela recaptção neuronal. Na conclusão deste estudo, eles reportaram que as NPs podem permear a BHE sem distúrbios nas funções cerebrais e sem efeitos neurotóxicos aparentes. No entanto, alguns estudos descrevem que as NPMs associadas a outras NPs podem promover citotoxicidade em células PC12, podendo alterar a expressão de genes dopaminérgicos sistêmicos causando depleção de dopamina, induzindo neurotoxicidade dopaminérgica e possivelmente mecanismos associados a neurodegeneração (Hu; Gao, 2010).

Neste contexto, a avaliação *in vivo* da administração de PTEe e PTEe-NPMs apresentou efeitos potencialmente neurotóxicos. Foi observado que a

administração sistêmica modulou possíveis efeitos neurotóxicos apontados pela depleção significativa do conteúdo de dopamina no estriado dos camundongos, mesmo que o conteúdo de dopamina não tenha demonstrado diferenças significativas nas outras estruturas.

Em comparação, Yadav e Yadav (2020) avaliaram o efeito de NPs metálicas de óxido de zinco em cérebros de camundongos através de avaliações comportamentais, estresse oxidativo e outros parâmetros bioquímicos. Estas NPs demonstraram ser tóxicas nas doses de 15 e 30mg/kg, após exposição oral crônica, causando comprometimento da memória, estresse oxidativo, diminuição do conteúdo de neurotransmissores (dopamina e norepinefrina) nos tecidos avaliados, bem como a presença de conteúdo de zinco no cérebro e plasma em comparação com o controle.

Após a síntese e caracterização das NPs, foi realizada a administração por via IP e os animais foram submetidos a análise comportamental. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros utilizados para avaliar o desenvolvimento de nocicepção mecânica (Teste de von Frey) e térmica ao frio ou calor (teste da acetona e teste de retirada da cauda respectivamente). Da mesma maneira, não foram observadas alterações significativas no teste de campo aberto, utilizado para avaliar atividade exploratória, ou no teste de rotarod, utilizado para avaliar equilíbrio e coordenação motora dos animais. Coletivamente, estes dados sugerem que as NPs de PTEe e PTEe-NPMs não são capazes de produzir sensibilização central ou alterações neurológicas significativas nos animais após administração aguda por via IP, indicando uma boa compatibilidade.

Assim, a redução no conteúdo de dopamina no tecido estriado, quando avaliada isoladamente indica uma possível toxicidade local, porém, considerando que não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados, são necessários mais estudos para investigar esta possibilidade. Caso confirmado o efeito das NPs sobre a redução de dopamina com ausência de toxicidade, estas NPs poderiam então ser investigadas para o tratamento de doenças que são caracterizadas pelo excesso desta monoamina, como por exemplo a esquizofrenia. A avaliação da atividade astrocitária, do estresse oxidativo, dos níveis de citocinas e de metabólitos da dopamina podem evidenciar com mais clareza o comportamento das NPs avaliadas em relação ao SNC.

Um papel fundamental da nanotoxicologia é entender os mecanismos de toxicidade das NPs, a fim de prever os riscos de saúde associados. Por causa de suas propriedades específicas em nanoescala, as NPs podem causar efeitos tóxicos nas células e tecidos. A indução do estresse oxidativo é um mecanismo importante de morte celular evocada por NPs (Song et al., 2016; Weiss et al., 2021), e é definido como o desequilíbrio entre a produção de EROs e ERNs e sua eliminação pelos sistemas antioxidantes intrínsecos do organismo. Este desequilíbrio pode levar a danos celulares irreversíveis e à morte celular em razão do prejuízo causado pela ação dos radicais livres, como citado anteriormente. O estresse oxidativo pode provocar ou exacerbar inflamação crônica através da ativação de diferentes fatores de transcrição relacionados a eventos inflamatórios, resultando na produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, que por sua vez também aumentam a produção de EROs e ERNs, prolongando o quadro de estresse (Jia et al., 2010; Pontes-quero et al., 2021; Pushpakumar; Kundu; Sen, 2014).

Para avaliar a capacidade das NPs de PTEe e PTEe-NPMs de induzir essa resposta, foi realizada a determinação intracelular de EROs (através dos níveis de DCFH e nitrito); a determinação dos marcadores de dano oxidativo (através da dosagem de carbonil e sulfidril); e a determinação de defesas antioxidantes (através da avaliação da atividade das enzimas GSH e SOD) em diferentes tecidos, que serão discutidos a seguir.

No tecido hepático, os níveis de DCFH nas duas NPs não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, sugerindo que não houve produção de espécies reativas de oxigênio em excesso. Por outro lado, os níveis de nitrito das duas NPs foram significativamente maiores em comparação com o grupo controle (Figura 5A). Os níveis normais de DCFH e aumentados de nitrito podem estar relacionados a proteção fisiológica dos hepatócitos e não com dano hepático, já que o fígado faz parte da rota de smetabolização das NPs (Iwakiri; Kim, 2015). Lang et al. (2007), demonstraram, que altos níveis de oxido nítrico tendem a inibir dano em tecidos extrapulmonares. O dano oxidativo foi examinado através da quantificação de carbonil e conteúdo de sulfidril (Figura 5B). A PTEe-NPMs apresentou uma diminuição significativa nos níveis de carbonil e sulfidril enquanto a PTEe apresentou uma diminuição significativa apenas nos níveis de sulfidril em comparação com o grupo controle. Uma vez que níveis de carbonil elevados

sinalizam dano proteico, esta diminuição é considerada positiva (Lang et al., 2007 Thakor et al., 2011, Balas et al., 2015).

Os níveis de SOD e GSH (Figura 5C) de ambas NPs PTEe e PTEe-NPMs apresentaram uma redução significativa quando comparados com o grupo controle. A redução foi mais pronunciada nos níveis de GSH, indicando que houve uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes. Resultados similares foram mostrados por Fernández-Urrusuno et al. (1997), após administração intravenosa de NPs de poli(isobutil cianoacrilato) e poliestireno em uma concentração de 20 mg/kg em ratos sprague-dawley machos). Os autores mostraram uma redução máxima nos níveis de GSH de 80% 24h após a administração das NPs (Fernández-Urrusuno et al., 1997). No entanto, esta redução foi considerada normal, mesmo com os níveis de GSH reduzidos até 90% (Uhlrig; Wendel, 1992). É importante enfatizar que em humanos a compensação da redução de GSH é requerida antes de atingir os níveis críticos (Uhlrig; Wendel, 1992). Em contraste com os níveis normais de DCFH, a redução da atividade das enzimas antioxidantes sugere que as NPs testadas foram capazes de neutralizar a produção de EROs.

Nos rins nenhuma das NPs provocou alterações significativas nos níveis de DCFH e nitrito (Figura 6A). Estes resultados sugerem que não houve nenhum dano ou inflamação tecidual após administração das NPs (Hauptenthal et al., 2020). As NPs PTEe-NPMs reduziram os conteúdos de carbonil e sulfidrilas indicando maior proteção das proteínas do que as NPs PTEe (Figura 6B). Como mostra a figura 6C, os níveis de GSH e SOD nos rins apresentaram uma redução significativa quando comparados com o grupo controle. Os rins também fazem parte da rota de excreção das NPs, portanto seria esperado que houvessem alterações neste tecido. Porém, não foi observada a produção de EROs ou nitrito, e a atividade das enzimas GSH e SOD sugerem o mesmo padrão observado no tecido hepático.

No pulmão, os níveis de DCFH e nitrito (Figura 7A), assim como os níveis de carbonil e sulfidrilas não foram afetados pela administração das NPs (Figura 7B). Em contraste, foi observada uma redução significativa nas enzimas antioxidantes (Figura 7C). Resultados similares foram mostrados por Balas et al (2015). Neste estudo, os autores demonstraram uma redução inicial nos níveis de GSH nos primeiros dias de tratamento seguido por um aumento nos níveis de GSH após 14 dias de exposição de NPMs revestida com micelas poliméricas de fosfolípido em tecido pulmonar de camundongos CD-1 (Balas et al., 2015). Novamente, a presença

das NPs pode ter desempenhado um papel antioxidante. Observando os níveis normais de DCFH e nitrito e níveis reduzidos de SOD e GSH, é possível inferir que não houve uma descompensação entre a produção de espécies reativas e a capacidade de neutralização.

No gastrocnêmio, a PTEe apresentou níveis significativamente reduzidos de DCFH em comparação com o grupo controle e o grupo PTEe-NPMs. Em contraste, PTEe-NPMs não apresentou diferenças significativas nos níveis de DCFH. Estes resultados podem sugerir a diminuição da formação de EROs após administração IP das NPs de PTEe quando expostas ao musculo gastrocnêmio. Os níveis de nitrito não foram afetados (Figura 8A). Pela análise das proteínas, pode ser observada uma diminuição significativa no conteúdo de sulfidril (Figura 8B), condizente com a diminuição da SOD e GSH (Figura 8C). Além disso, as enzimas antioxidantes também foram afetadas após administração IP, mostrando uma diminuição em relação ao controle, o que sugere que as NPs tenham apresentado um comportamento potencialmente antioxidante.

No coração, os níveis de DCFH também diminuíram após a administração IP das NPs de PTEe (Figura 9A). Em contraste, os níveis de nitrito aumentaram significativamente, sugerindo uma proteção ao tecido proveniente da vasodilatação. Os outros parâmetros analisados, como proteínas e enzimas antioxidantes não foram afetados após administração IP neste tecido (Figuras 9B e 9C).

Considerando que um quadro de estresse oxidativo é sinalizado pelo desbalanço entre a produção de espécies reativas e enzimas antioxidantes, a administração das NPs não provocou alterações capazes de produzir este quadro em nenhum dos tecidos avaliados. Coletivamente, os parâmetros avaliados sugerem que as NPs de PTEe e PTEe-NPMs não são potencialmente tóxicas em camundongos. Porém, estes resultados são contrapostos com a ausência de outros parâmetros importantes para a análise da toxicidade como a avaliação de citocinas, interleucinas e enzimas renais e hepáticas, bem como avaliações histológicas dos principais tecidos.

Por fim, os resultados apresentados - até então ausentes na literatura atual - em conjunto com os dados já publicados a respeito da atividade *in vitro* das NPs testadas, servem como ponto de partida para o entendimento da toxicidade de sistemas poliméricos em nanoescala, colaborando para a evolução cada vez mais acentuada da nanobiotecnologia, principalmente na área biomédica.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que as NPs de PTEe e PTEe superparamagnéticas, na concentração de 20mg/kg, sintetizadas pela polimerização em miniemulsão de tiol-eno não evidenciaram alterações importantes nos diferentes parâmetros bioquímicos dos diferentes órgãos analisados. Também não foram observadas alterações comportamentais, indicando que ambas as NPs possuem boa biocompatibilidade podendo então, ser atrativas para aplicação biomédica, como carreadores de fármacos perante estudos mais detalhados.

REFERÊNCIAS

Akkermans, P. W. C. Voogd, J. Holstege, J.C Luiten, P.G.M. Voom, P. Zeeuw, C.I. de The Dopaminergic Innervation Of The Brain Stem And Spinal Cord: An Anatomical Study On The Distribution Of The Neurotransmitter Dopamine And Its D2 Receptor, 2001.

Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC . Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. 2008.

Angelopoulou A, Voulgari E, Kolokithas-Ntoukas A, Bakandritsos A, Avgoustakis K. Magnetic Nanoparticles for the Delivery of Dapagliflozin to Hypoxic Tumors: Physicochemical Characterization and Cell Studies. AAPS PharmSciTech. 2017.

Avval ZM, Malekpour L, Raeisi F, Babapoor A, Mousavi SM, Hashemi SA, Salari M. Introduction of magnetic and supermagnetic nanoparticles in new approach of targeting drug delivery and cancer therapy application. Drug Metabolism Reviews, p. 1–28, dez. 2019.

Balas MR, Popescu IMD, Hermenean A, Cinteză OL, Burlacu R, Ardelean A, Dinischiotu A. Exposure to iron oxide nanoparticles coated with phospholipid-based polymeric micelles induces biochemical and histopathological pulmonary changes in mice. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 12, p. 29417–29435, 2015.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. Methods of biochemical analysis, v. 32, p. 279–312, 1987.

Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. 2014.

Bernardy N, Romio AP, Barcelos EI, Dal Pizzol C, Dora CL, Lemos-Senna E, Araujo PHH, Sayer C. Nanoencapsulation of quercetin via miniemulsion polymerization. Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 6, n. 2, p. 181–186, 2010.

Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. 2007.

Cardoso PB, Machado TO, Feuser PE, Sayer C, Meier MAR, Araújo PHH. Biocompatible polymeric nanoparticles from castor oil derivatives via thiol-ene miniemulsion polymerization. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 1700212, p. 1–8, 2017.

CARDOSO, P. B. Machado T. O., Feuser PE, Sayer C, Meier, M.A., Araújo P.H.H. Biocompatible Polymeric Nanoparticles From Castor Oil Derivatives via Thiol-Ene Miniemulsion Polymerization. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 120, n. 1, p. 1–8, 2018.

Chircov, VASC, Grumezescu AM, Andronescu E. Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies, 2021.

Dayem AA, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.

De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento, DD, De Nuccio F, La Pesa V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 98, p. 266–270, 1 set. 2014.

De Meneses AC, Machado TO, Sayer C, Araújo PHH, De Oliveira D. Development of antioxidant poly(thioether-ester) nanoparticles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 35, n. 2, p. 691–697, 2018.

De Miguel M, Kraychete DC. Pain in Patients with Spinal Cord Injury: A Review. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, v. 59, n. 3, p. 350–357, 2009.

De Prá SDT, Antoniazzi CTD, Ferro PR, Kudsi SQ, Camponogara C, Fialho MFP, Rigo FK, Gomez MV, Bochi GV, Moresco RN, Oliveira SM, Trevisan G. Nociceptive mechanisms involved in the acute and chronic phases of a complex regional pain syndrome type 1 model in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 859, n. July, p. 172555, 2019.

Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 20, p. 441–462, 1980.

Dukhin SS, Labib ME. Convective diffusion of nanoparticles from the epithelial barrier toward regional lymph nodes *Advances in Colloid and Interface Science* Elsevier B.V., , 1 nov. 2013.

Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem Soc Rev*, v. 41, n. 7, p. 2545–2561, 2013.

Fernández-Urrusuno R, Fattal E, Féger J, Couvreur P, Théron P. Evaluation of hepatic antioxidant systems after intravenous administration of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, v. 18, n. 6, p. 511–517, 1997.

Feuser PE, Bubniak LS, Silva MCS, Viegas AC, Fernandes C, Ricci-Jr E, Nele M, Tedesco AC, Sayer C, Araújo PHH. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. *European Polymer Journal*, v. 68, p. 355–365, 2015.

Feuser PE, Bubniak LS, Bubniak LS, Valério A, Santos-Silva MC, Ricci-Junior E, Sayer C, Araújo PHH. In Vitro Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles and Nanocapsules Obtained by Miniemulsion Polymerization for Drug Delivery Application. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 7, p. 7669–7676, 2016.

Feuser PE, Chiaradia V, Galvani NC, Scussel R, Ávila RAM, De Oliveira D, Araújo PHHD, Sayer C. In vitro cytotoxicity and hyperthermia studies of superparamagnetic poly(urea-urethane) nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization in human erythrocytes and NIH3T3 and HeLa cells. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, p. in press, mar. 2020.

Fornaguera C, Calderó G, Mitjans M, Vinardell MP, Solans C, Vauthier C. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: Protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale*, v. 7, n. 14, p. 6045–6058, 2015.

Gupta J, Fatima MT, Islam Z, Khan RH, Uversky VN, Salahuddin P. Nanoparticle formulations in the diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 130, p. 515–526, 2019.

Hauptenthal DPS, Dias FM, Zaccaron RP, Silveira GDB, Corrêa MEAB, Mendes C, Casagrande LDR, Pinho RA, De Andrade TAM, Feuser PE, Paula MMS, Silveira PCL. Effects of phonophoresis with ibuprofen associated with gold nanoparticles in animal model of traumatic muscle injury. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 143, p. 105120, fev. 2020.

Hauser AK, Wydra RJW, Stocke NA, Anderson KW, Hilt JZ. Magnetic nanoparticles and nanocomposites for remote controlled therapies. *Journal of Controlled Release*, v. 219, p. 76–94, 2015.

He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.

Hoelscher F, Machado TO, De Oliveira D, Araújo PHH, Sayer C. Enzymatically catalyzed degradation of poly (thioether-ester) nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, v. 156, p. 211–217, 2018.

Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 2, p. 265–273, maio 2013.

Hu Y-L, GAO JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 394, n. 1–2, p. 115–121, 2010.

Huang CC, Aronstam RS, Chen D-R, Huang YW. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 1, p. 45–55, 1 fev. 2010.

Huang Y-W, Wu C-H, Aronstam RS. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from in vitro Studies. *Materials*, v. 3, p. 4842–4859, 2010.

Su, B. E., Jeong L, Ae, Yoonsoo B, Ataoka, Kazunori KI, Dukjoon K, Ee, Doo Sung L, Sung Chul K. In vitro Release and in vivo Anti-tumor Efficacy of Doxorubicin from Biodegradable Temperature-sensitive. v. 40, n. 2, p. 171–176, 2008.

Iqbal MA, Md S, Sahni JK, Baboota S, Dang S, Ali J. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, v. 20, n. 10, p. 813–830, 2012.

Iwakiri Y, KIM MY. Nitric oxide in liver diseases *Trends in Pharmacological Sciences* Elsevier Ltd, , ago. 2015.

Jain V, Jain S, Mahajan SC. Nanomedicines Based Drug Delivery Systems for Anti-Cancer Targeting and Treatment. *Current Drug Delivery*, v. 12, n. 2, p. 177–191, 2015.

Jia J, Muralikrishnan S, Ng C-T, Yung L-YL, Bay B-H. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. 2010.

Joseph E, Singhvi G. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. In: *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 91–116.

Kim JS, Yoon T-J, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee J-K, Cho MH. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*, v. 89, n. 1, p. 338–347, 2006.

Landfester K, Mailänder V, Maila V. Nanocapsules with specific targeting and release properties using miniemulsion polymerization. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 10, n. 5, 2013.

Lang Jr JD, Teng X, Chumley P, Crawford JH, Isbell TS, Chacko BK, Liu Y, Jhala N, Crowe DR, Smith AB, Cross RC, Frenette L, Kelley EE, Wilhite DW, Hall CR, Page, GP, Fallon MB, Bynon JS, Eckhoff DE, Patel RP. Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 9, p. 2583–2591, set. 2007.

Levine BRL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, Ahn B-W, Shaltiel S, Stadtman ER. [49] Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. v. 186, n. 1983, p. 464–478, 1990.

Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles *Free Radical Biology and Medicine* Pergamon, 1 maio 2008.

Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 1, p. 149–173, 2010.

Lima VS, Guimarães ATB, Araújo APDC, Estrela FN, Da Silva IC, De Melo NFS, Fraceto LF, Malafaia G. Depression, anxiety-like behavior, and memory impairment in mice exposed to chitosan-coated zein nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 11, p. 10641–10650, 2019.

Liu Y, Li W, Lao F, Liu Y, Wang L, Bai Ru, Zhao Y, Chen C. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterials*, v. 32, n. 32, p. 8291–8303, 1 nov. 2011.

Liu Y, Hou W, Sun H, Cui C, Zhang L, Jiang Y, Wu Y, Wang Y, Li J, Sumerlin BS, Liu Q, Tan W. Thiol-ene click chemistry: A biocompatible way for orthogonal bioconjugation of colloidal nanoparticles. *Chemical Science*, v. 8, n. 9, p. 6182–6187, 2017.

Lowry H, Randall RJ. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

Ma L, Zou X, Chen W. A new x-ray activated nanoparticle photosensitizer for cancer treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 10, n. 8, p. 1501–1508, 2014.

Machado TO, Cardoso PB, Feuser PE, Sayer C, Araújo PHH. Thiol-ene miniemulsion polymerization of a biobased monomer for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 159, p. 509–517, 2017.

Martins JB, Mendonça VA, Aguiar GC, Fonseca SF, Dos Santos JM, Tossige-Gomes R, Melo DS, Oliveira MX, Leite HR, Camargos ACR, Ferreira AJ, Coimbra CC, Poortmans J, Oliveira VC, Silva SB, Domingues TE, Bernardo M, Lacerda ACR. Effect of a Moderate-Intensity Aerobic Training on Joint Biomarkers and Functional Adaptations in Rats Subjected to Induced Knee Osteoarthritis. *Frontiers in Physiology*, v. 10, n. September, p. 1–10, 2019.

Dos Santos PCM, Feuser PE, Cardoso PB, Steiner BT, Córneo ES, Scussel R. Evaluation of in vitro cytotoxicity of superparamagnetic poly(thioether-ester) nanoparticles on erythrocytes, non-tumor (NIH3T3), tumor (HeLa) cells and hyperthermia studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 29, n. 16, p. 1935–1948, 2018.

Núñez C, Estévez SV, Chantada MP. Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 331–345, 2018.

Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2005.

Evan P, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Carvajal RD, Mohan P, Ye Y, Humm J, Gönen M, Kalaigian H, Schöder H, Strauss HW, Larson SM, Wiesner U Bradbury MS. Clinical translation of an ultras-small inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.

Pontes-Quero GM, Benito-Garzón L, Cano JP, Aguilar MR, Vázquez-Lasa B. Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-

inflammatory and biocompatibility studies. *Materials Science and Engineering C*, v. 121, p. 111793, 2021.

Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Current medicinal chemistry*, v. 21, n. 32, p. 3662–72, 2014.

Reis CP, Neufeld RJ. Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. v. 2, p. 8–21, 2006.

Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Anais...Elsevier, 30 dez. 2005

Romio AP, Bernardy N, Senna EL, Araújo PHH, Sayer C. Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. *Materials Science & Engineering C*, v. 29, n. 2, p. 514–518, 2009.

Ruenraroengsak P, Novak P, Berhanu D, Thorley AJ, Valsami-Jones E, Gorelik J, Korchev YE, Tetley TD. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology*, v. 6, n. 1, p. 94–108, 2012.

Schaffazick SR, Guterres SS. Caracterização E Estabilidade Físico-Química De Sistemas Poliméricos Nanoparticulados Para Administração De Fármacos. *Quim. Nova*, 2003.

Schmid G. The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters. *Chemical Society Reviews*, v. 37, n. 9, p. 1909–1930, 2008.

Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. n. February, p. 1–6, 2015.

Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, S. Laird Forrest, M. Stroeve, P. Mahmoudi, M. Toxicity of nanomaterials *Chemical Society Reviews* NIH Public Access, mar. 2012.

Shen L, Wang W, Li S, Qin J, Huang Y. NMDA receptor antagonists attenuate intrathecal morphine-induced pruritus through ERK phosphorylation. *Molecular Brain*, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery *Experimental and Molecular Pathology* Academic Press, , 1 jun. 2009.

Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro J-M, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *NanoToday* Elsevier, , 1 out. 2011.

Song B, Zhou T, Yang WL, Liu J, Shao LQ. Contribution of oxidative stress to TiO₂ nanoparticle-induced toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 48, p. 130–140, 2016.

Song W, Derito CM, Liu MK, He X, Dong M, Liu RH. Cellular Antioxidant Activity of Common Vegetables. *J. Agric. Food Chem*, v. 58, p. 6621–6629, 2010.

Spirou SV, Lima SAC, Bouziotis P, Vranješ-Djurić S, Efthimiadou EK, Laurenzana A, Barbosa AI, Garcia-Alonso I, Jones C, Jankovic D, Gobbo OL. Recommendations for In Vitro and In Vivo Testing of Magnetic Nanoparticle Hyperthermia Combined with Radiation Therapy. 2018. v. 8

Standaert DG, Galanter JM. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: *Princípios de Farmacologia: A base da farmacoterapia*. 2018.

Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*, v. 13, 2018.

Thakor AS, Paulmurugan R, Kempen P, Zavaleta C, Sinclair R, Massoud TF, Gambhir SS. Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells. *Small*, v. 7, n. 1, p. 126–136, 2011.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*, 2006.

Ulbrich K, Holá K, Subr V, Bakandritsos A, Tuček J, Zbořil R. Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 9, p. 5338–5431, 2016.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* Elsevier Ireland Ltd, 10 mar. 2006.

Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3445–3471, 2012.

Weiss M, Fan J, Claudel M, Lebeau L, Pons F, Ronzani C. Combined in vitro and in vivo approaches to propose a putative adverse outcome pathway for acute lung inflammation induced by nanoparticles: A study on carbon dots. *Nanomaterials*, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.

Wu X, Tan Y, Mao H, Zhang M. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, n. 1, p. 385–399, 2010.

Yadav E, Yadav P. Biofabricated zinc oxide nanoparticles impair cognitive function via modulating oxidative stress and acetylcholinesterase level in mice. *Environmental Toxicology*, n. November 2020, p. 572–585, 2020.

Yang J, Liu J, Wang P, Sun J, Lv X, Diao Y. Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on corneas in vitro and in vivo. *Aging*, v. 13, n. 4, p. 5020–5033, 2021.

Zhang S, Gao H, Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis Graphical Abstract HHS Public Access. *ACS Nano*, v. 9, n. 9, p. 8655–8671, 2015.

Zhao Y, Sun X, Zhang G, Trewyn BG, Slowing II, Lin VS-Y. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: Size and surface effects. *ACS Nano*, v. 5, n. 2, p. 1366–1375, 2011.

ANEXO

ANEXO A – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 30/05/2017.

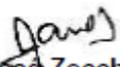
Título do projeto	Avaliação in vivo da genotoxicidade e de parâmetros bioquímicos de três sistemas nanoparticulados poliméricos
Project title	In vivo evaluation of genotoxicity and biochemical parameters of the three polymer nanoparticulate systems
Número do protocolo Protocol number	063/2017-1
Pesquisador principal Principal Investigator	Ricardo Andrez Machado de Ávila
Pesquisadores Researchers	Paulo Emilio Feuser, Adriani Paganini Damiani, Maiara Pereira, Rahisa Scussel, Alessandra Milioli, Bethina Trevisol Steiner, Luiza Macarini Bosa, Ellen de Pieri, Júlia Mendes

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2017 a 01/07/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	126
Idade/Peso	28-35 dias / 18-22 g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 30 de maio de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

