

LARISSA BARBOSA DE PAULA

**“Nanopartículas Poliméricas e de Prata: Avaliação da Toxicidade
in vitro e *in vivo* e do Processo de Cicatrização em Animais
Submetidos à Queimadura Térmica”**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA BARBOSA DE PAULA

“Nanopartículas Poliméricas e de Prata: Avaliação da Toxicidade
in vitro e *in vivo* e do Processo de Cicatrização em Animais
Submetidos à Queimadura Térmica”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Larissa Barbosa de Paula
Bluba
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de Mestra
em Biologia Funcional e Molecular, área
de concentração em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia da Silva Melo

Coorientadora: Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Campinas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D44n	<p>De Paula, Larissa Barbosa, 1985- Nanopartículas poliméricas e de prata: avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e do processo de cicatrização em animais submetidos à queimadura térmica / Larissa Barbosa de Paula. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Patrícia da Silva Melo. Coorientador: Priscyla Daniely Marcato Gaspari. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Cicatrização. 2. Citotoxicidade. 3. Nanopartículas de prata. 4. Nanopartículas poliméricas. 5. Queimaduras. I. Melo, Patricia da Silva. II. Gaspari, Priscyla Daniely Marcato. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Polymeric and silver nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* toxicity and evaluation of the healing process in animals subjected to thermal burn

Palavras-chave em Inglês:

Wound healing

Cytotoxicity

Silver nanoparticles

Polymeric nanoparticles

Burns

Área de concentração: Bioquímica

Títuloção: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Patrícia da Silva Melo [Orientador]

Daniele Ribeiro de Araújo

Lucimara Gaziola de la Torre

Data da defesa: 15-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

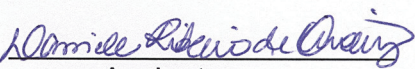
Campinas, 15 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

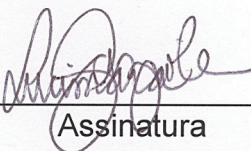
Profa. Dra. Patricia da Silva Melo (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo


Assinatura

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre


Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Assinatura

*Aos meus pais, Marli e Carlos Francisco, por todo o amor e suporte. Sem vocês, tudo isso não teria sido possível. Ao meu namorado, André, por compreender minha falta de tempo e meus momentos de estresse, pelo companheirismo e por não me deixar desanimar. **Amo vocês!***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo, por ter acreditado na minha capacidade, por todo o apoio e empenho para que eu conseguisse o melhor durante a realização deste trabalho, pela amizade e pelo carinho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, pelos ensinamentos e por ter dedicado parte de seu corrido tempo para auxiliar, sugerir e corrigir este trabalho.

Ao professor Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero, por ter aberto as portas de seu laboratório e me recebido com o mesmo carinho e atenção com que recebe seus alunos. Um exemplo invejável de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Às professoras Dra. Daniele Ribeiro de Araújo e Dra. Lucimara Gaziola de la Torre, pela participação nas minhas bancas e pelas correções e sugestões.

Ao professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pela participação na minha banca de qualificação e pelas correções e sugestões.

Às professoras Dra. Ana Beatriz Albino de Almeida e Dra. Adriana Souza Torsoni, pelo auxílio na indução das queimaduras, sacrifício dos animais, coleta das amostras e análises histológicas.

À lasmin, por toda a ajuda no cultivo das células e nos testes de citotoxicidade. Tenho certeza de que você irá longe!

Aos alunos do curso de Ciências Biomédicas da Faculdade Metrocamp Grupo Ibmec Educacional, pela ajuda nas análises bioquímicas e hematológicas, pelo apoio dado neste início da minha carreira acadêmica, pelo carinho, amizade e momentos de descontração nas aulas. Que todos vocês tenham um futuro brilhante!

À “Gê”, por todo o cuidado e carinho com os animais e pela imensa ajuda na indução das queimaduras e nos períodos de tratamento e sacrifício. Um exemplo de pessoa dedicada e que ama o que faz, independentemente do reconhecimento e do retorno financeiro.

Ao microscopista Daniel Razzo, pela realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Hospital SOBRAPAR – Crânio e Face, por ter concedido o biotério para indução das queimaduras, tratamento e sacrifício dos nossos animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Aos alunos e “agregados” do Laboratório de Química Biológica: Dani Ridolfi, Dani Pott, Marina, Lucas, Elias, Stephany, Ana, Junko e Almas, pela ajuda, amizade e momentos de descontração. Sentirei saudades!

Às minhas queridas Aline e Liliane, por estarem do meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida; dando apoio, animando e mimando. Obrigada por tudo! ♥

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Não tenhas medo não só de levar pancada, mas também de expor tuas ideias. Porque se tiveres medo, nunca poderás criar nada original. É preciso que não tenhas medo de dizer alguma coisa que possa ser considerada como erro, porque tudo o que é novo aparece aos olhos antigos como coisa errada. E é sempre nesta violação do que é considerado certo, que nasce o novo e há a criação.”

Mário Schenberg

RESUMO

DE PAULA, L. B. **Nanopartículas Poliméricas e de Prata: Avaliação da Toxicidade *in vitro* e *in vivo* e do Processo de Cicatrização em Animais Submetidos à Queimadura Térmica.** 2013. 146 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

Queimaduras representam um problema de saúde pública, gerando um gasto anual de cerca de R\$ 55 milhões ao Sistema Único de Saúde (SUS). Os produtos destinados ao tratamento de queimaduras são em sua grande maioria importados, tornando relevantes estudos que visem ao desenvolvimento de materiais com características adequadas ao tratamento e produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo e fácil obtenção. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos e o potencial de cicatrização de S-Nitrosoglutathione (GSNO) encapsulado em nanopartículas poliméricas (alginato-quitosana e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) recobertas por quitosana) e de nanopartículas de prata (AgNPs). O GSNO foi sintetizado através de reação de S-Nitrosação direta de glutathione e caracterizado por espectrofotometria. As nanopartículas de alginato-quitosana (AG/CS) contendo GSNO foram preparadas através do método de gelificação iônica. As nanopartículas de PCL recobertas por quitosana (PCL/CS) e contendo GSNO foram preparadas através do método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente. Ambas as nanopartículas foram caracterizadas por espectroscopia de correlação de fótons (ECF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As AgNPs foram produzidas extracelularmente por método biotecnológico utilizando-se o fungo *Fusarium oxysporum* e caracterizadas por ECF e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A toxicidade *in vitro* das nanopartículas foi avaliada através de ensaios de citotoxicidade utilizando-se cultura de células de linhagens pré-estabelecidas e o potencial de cicatrização foi avaliado através de indução de queimadura térmica em ratos Wistar machos, os quais foram posteriormente eutanaziados para avaliação da toxicidade *in vivo* das nanopartículas. As AG/CS contendo GSNO apresentaram diâmetro médio de $321,0 \pm 12,2$ nm e potencial Zeta de $+37,6 \pm 0,6$ mV. As PCL/CS contendo GSNO apresentaram-se esféricas, com diâmetro médio de $448,6 \pm 35,38$ nm e potencial Zeta de $+23,11 \pm 4,75$ mV. As AgNPs apresentaram-se esféricas e altamente estáveis, com diâmetro médio de $7,3 \pm 3,0$ nm e potencial Zeta de $-31,1 \pm 2,09$ mV. As nanopartículas apresentaram-se pouco tóxicas *in vitro* e *in vivo*. O tratamento das lesões com as nanopartículas reduziu a área lesionada em praticamente 100% após 35 dias, diminuindo o tempo necessário para a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, e revertendo o processo inflamatório mais rapidamente. Nossos resultados indicam que os sistemas nanoparticulados estudados podem fornecer uma nova e eficaz direção terapêutica para o tratamento de queimaduras.

Palavras-chave: cicatrização; citotoxicidade; nanopartículas de prata; nanopartículas poliméricas; queimadura.

ABSTRACT

DE PAULA, L. B. **Polymeric and Silver Nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* Toxicity and Evaluation of the Healing Process in Animals Submitted to Thermal Burn.** 2013. 146 f. Thesis (Master's degree in Functional and Molecular Biology, concentration area in Biochemistry) – Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, 2013.

Burn injuries represent a public health problem, generating an annual cost of about R\$ 55 million to the Brazilian Unified Health System. The products for the treatment of burns are mostly imported, so studies aimed at developing materials with appropriate characteristics to the treatment and produced from cheap raw materials and easily obtained are relevant. The aim of this study was to evaluate the possible toxic effects and healing potential of S-Nitrosoglutathione (GSNO) encapsulated in polymeric nanoparticles (alginate-chitosan and chitosan-coated poly(ϵ -caprolactone) (PCL)) and silver nanoparticles (AgNPs). GSNO was synthesized by direct S-Nitrosation reaction of glutathione (GSH) and characterized by spectroscopic analysis. Alginate-chitosan nanoparticles (AG/CS) loaded with GSNO were prepared through ionic gelation method. Chitosan-coated PCL nanoparticles (PCL/CS) loaded with GSNO were prepared by the double emulsion method (water/oil/water) and solvent evaporation. Both of the nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). AgNPs were produced extracellularly by a biotechnological method using the fungus *Fusarium oxysporum* and characterized by DLS and transmission electron microscopy (TEM). The *in vitro* toxicity of the nanoparticles was assessed through cytotoxic assays using cell culture of predetermined strains and healing potential was evaluated through thermal burn induced in male Wistar rats, which were subsequently euthanized for evaluation of the *in vivo* toxicity of the nanoparticles. AG/CS loaded with GSNO had an average diameter of 321.0 ± 12.2 nm and Zeta potential of $+37.6 \pm 0.6$ mV. PCL/CS loaded with GSNO were spherical, with an average diameter of 448.6 ± 35.38 nm and Zeta potential of $+23.11 \pm 4.75$ mV. AgNPs were spherical and highly stable, with an average diameter of 7.3 ± 3.0 nm and Zeta potential of -31.1 ± 2.09 mV. The nanoparticles were slightly toxic *in vitro* and *in vivo*. The treatment of the burns with the nanoparticles reduced the burned area in almost 100% after 35 days, decreasing the required time for fibroblasts differentiation into myofibroblasts, and reversing the inflammatory process faster. Our results showed that the studied nanoparticulated systems may provide a novel and effective therapeutic direction for the treatment of burn injuries.

Keywords: wound healing; cytotoxicity; silver nanoparticles; polymeric nanoparticles; burn injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das camadas da pele acometidas conforme a profundidade da lesão. A – Queimadura de 1º grau. B – Queimadura de 2º grau. C – Queimadura de 3º grau.....	24
Figura 2 - Porcentagens utilizadas, em adultos e crianças, para cálculo da superfície corporal total acometida pela queimadura e estimativa de sua extensão..	25
Figura 3 - Representação das camadas da pele e do tecido subcutâneo (hipoderme)..	27
Figura 4 - Fases da cicatrização..	30
Figura 5 - Representação das possíveis vias de permeação de fármacos através das camadas da pele.	32
Figura 6 - Mecanismos hipotéticos da biossíntese extracelular de nanopartículas de prata (AgNPs) por agentes redutores específicos do <i>Fusarium oxysporum</i> ..	36
Figura 7 - Representação esquemática dos tipos de nanopartículas poliméricas e possíveis disposições do fármaco nas mesmas.....	38
Figura 8 - Administração de fármacos convencional <i>versus</i> utilizando-se sistemas de liberação sustentada	39
Figura 9 - Estrutura química do alginato.	40
Figura 10 - Estrutura química da quitina e do produto de sua desacetilação, a quitosana	41
Figura 11 - Representação esquemática dos benefícios de curativos à base de quitosana.....	42
Figura 12 - Estrutura química do poli(ε-caprolactona) (PCL).....	44
Figura 13 - Principais tipos celulares responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NO) e respectivas isoformas da enzima NO sintase (NOS) atuantes nestas células	45
Figura 14 - Estrutura química da glutathiona (GSH)	47
Figura 15 - Reações pelas quais a glutathiona (GSH) reage com o óxido nítrico (NO) para formar S-Nitrosoglutathiona (GSNO).....	48
Figura 16 - Molde de borracha isolante, com abertura central circular de 3 cm de diâmetro, utilizado para indução da queimadura térmica nos animais.....	69

Figura 17 - Espectro UV-Vis da síntese de GSNO.....	75
Figura 18 - Espectros UV-Vis da decomposição de duas amostras de GSNO (A e B), sintetizadas em dias diferentes, 3 e 8 meses após a síntese, respectivamente.	76
Figura 19 - Estabilidade físico-química de AG/CS e AG/CS contendo GSNO	77
Figura 20 - Estabilidade físico-química de PCL/CS com diferentes volumes finais (10 mL, 15 mL, 30 mL e 40 mL)	80
Figura 21 - Imagem obtida por MEV de PCL/CS com volume final de 10 mL (x 2,000). 82	
Figura 22 - Estabilidade físico-química de PCL/CS contendo diferentes concentrações de GSNO (10 mg, 15 mg, 20 mg e 25 mg).....	83
Figura 23 - Estabilidade físico-química de três amostras, preparadas no mesmo dia, de PCL/CS contendo 20 mg de GSNO	85
Figura 24 - Imagem obtida do vídeo, em tempo real, do movimento Browniano de PCL/CS contendo GSNO.	87
Figura 25 - Imagens obtidas por MEV de PCL/CS contendo GSNO em menor e maior aumento (A e B, respectivamente)	88
Figura 26 - Béqueres contendo solução aquosa de AgNO_3 10^{-2} M, no início da reação (A) e após 24 horas (B).	89
Figura 27 - Espectros UV-Vis da reação de uma solução aquosa de AgNO_3 10^{-2} M em função do tempo.....	90
Figura 28 - Estabilidade físico-química de AgNPs	91
Figura 29 - Imagem obtida do vídeo, em tempo real, do movimento Browniano de AgNPs.	92
Figura 30 - Imagem obtida por MET de AgNPs sintetizadas por método biológico utilizando-se o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	93
Figura 31 - Viabilidade de células V79 (A) e hepatócitos (B) após tratamento com GSNO livre por 24 horas.....	96
Figura 32 - Viabilidade de células V79 após tratamento com AG/CS (A) e AG/CS contendo GSNO (B) por 24 horas	98
Figura 33 - Viabilidade de células 3T3 após tratamento com AG/CS (A) e AG/CS contendo GSNO (B) por 24 horas	100

Figura 34 - Viabilidade de hepatócitos após tratamento com AG/CS contendo GSNO por 24 horas	101
Figura 35 - Viabilidade de células V79 após tratamento com PCL/CS (A) e PCL/CS contendo GSNO (B) por 24 horas	103
Figura 36 - Viabilidade de células 3T3 após tratamento com PCL/CS (A) e PCL/CS contendo GSNO (B) por 24 horas	105
Figura 37 - Viabilidade de hepatócitos após tratamento com PCL/CS (A) e PCL/CS contendo GSNO (B) por 24 horas	107
Figura 38 - Viabilidade de células V79 após tratamento com AgNPs por 24 horas	108
Figura 39 - Viabilidade de células 3T3 após tratamento com AgNPs por 24 horas	109
Figura 40 - Viabilidade de hepatócitos após tratamento com AgNPs por 24 horas	111
Figura 41 - Concentração sérica de creatinina (A) e ureia (B) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	114
Figura 42 - Concentração sérica de proteínas totais dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	116
Figura 43 - Concentração sérica de aspartato aminotransferase (A) e alanina aminotransferase (B) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados.....	118
Figura 44 - Relação AST/ALT dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados....	119
Figura 45 - Concentração sérica de fosfatase alcalina dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	120
Figura 46 - Concentração sérica de glicose dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados.....	122

Figura 47 - Contagem absoluta de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	124
Figura 48 - Contagem absoluta de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	125
Figura 49 - Contagem absoluta de hemoglobina ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	126
Figura 50 - Hematócrito (%) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados....	127
Figura 51 - Contagem absoluta de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados	128
Figura 52 - Concentração de prata, obtida através de ICP-OES, no sangue e em diferentes órgãos dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados.....	130
Figura 53 - Diâmetro das lesões (%) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados....	132
Figura 54 - Cortes histológicos da pele dorsal dos animais após tratamento com GSNO	133
Figura 55 - Cortes histológicos da pele dorsal dos animais após tratamento com GSNO encapsulado em PCL/CS	135
Figura 56 - Cortes histológicos da pele dorsal dos animais após tratamento com AgNPs	136
Figura 57 - Curva de calibração utilizada para o cálculo da concentração de GSNO..	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de AG/CS vazias e contendo GSNO	78
Tabela 2 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de PCL/CS vazias e com diferentes volumes finais	81
Tabela 3 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho, potencial Zeta e EE de PCL/CS contendo GSNO em diferentes concentrações	84
Tabela 4 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de PCL/CS contendo 20 mg de GSNO	86
Tabela 5 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de AgNPs ao longo de 120 dias	91
Tabela 6 – Valores de IC ₅₀ de GSNO livre, nanopartículas poliméricas (contendo ou não GSNO) e nanopartículas de prata, obtidos após ensaios de citotoxicidade realizados em células V79, 3T3 e hepatócitos	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG/CS	Nanopartículas de alginato recobertas com quitosana
AgNPs	Nanopartículas de prata
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CO ₂	Dióxido de carbono
DL ₅₀	Dose letal 50
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
ECF	Espectroscopia de correlação de fótons
EE	Eficiência de encapsulação
eNOS	NO sintase endotelial
FA	Fosfatase alcalina
FDA	Food and Drug Administration
GO	Glutathione oxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSNO	S-Nitrosoglutathione
GSSH	Glutathione disulfide
Hb	Hemoglobina

HBBS	Solução salina equilibrada de Hank
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina e Eosina
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado
iNOS	NO sintase induzível
ISBI	International Society for Burn Injuries
ISO	International Standard Organization
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMC	Mitomicina C
MPEG	Mono-metoxi-polietilenoglicol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium)
NH ₃	Amônia
nNOS	NO sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Poly(ϵ -Caprolactona)
PCL/CS	Nanopartículas de Poly(ϵ -Caprolactona) recobertas com quitosana
Pdl	Índice de polidispersão
PEC	Complexo polieletrólítico

PGA	Poli(ácido glicólico)
PHA	Poli(hidro)alcanoatos
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PT	Proteínas totais
PVA	Poli(vinil álcool)
RSNOs	S-Nitrosotióis
SES-SP	Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SRE	Sistema retículo endotelial
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
VCM	Volume corpuscular médio
VN	Vermelho neutro

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Queimaduras.....	23
1.2 Pele	26
1.3 Processo de Cicatrização.....	28
1.4 Administração Tópica de Medicamentos.....	31
1.5 Tratamento de Queimaduras.....	33
1.6 Nanotecnologia	34
1.6.1 Nanopartículas de Prata.....	35
1.6.2 Nanopartículas Poliméricas e Sistemas de Liberação Sustentada	37
1.7 S-Nitrosoglutationa.....	45
1.8 Avaliação de Efeitos Tóxicos <i>In Vitro</i>	50
1.8.1 Testes de Citotoxicidade	51
2 OBJETIVOS.....	55
2.1 Objetivos Específicos	55
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 Síntese e Decomposição de S-Nitrosoglutationa (GSNO)	59
3.2 Preparação das Nanopartículas Poliméricas.....	60
3.2.1 Nanopartículas de Alginato-Quitossana (AG/CS) Contendo GSNO	60
3.2.2 Nanopartículas de Poli(ε-Caprolactona) (PCL) Recobertas por Quitossana (PCL/CS) e Contendo GSNO.....	60
3.3 Eficiência de Encapsulação do GSNO nas Nanopartículas	61
3.4 Síntese das Nanopartículas de Prata (AgNPs)	62

3.5 Caracterização das Nanopartículas	62
3.5.1 Caracterização Físico-Química	62
3.5.2 Caracterização Morfológica.....	63
3.5.2.1 Nanopartículas Poliméricas.....	63
3.5.2.2 Nanopartículas de Prata (AgNPs)	63
3.6 Administração das Nanopartículas.....	63
3.7 Avaliação do Potencial Cytotóxico de GSNO e das Nanopartículas	64
3.7.1 Cultura de Células V79.....	64
3.7.2 Cultura de Células 3T3.....	65
3.7.3 Cultura Primária de Hepatócitos.....	65
3.7.4 Ensaio de Toxicidade In Vitro	66
3.7.4.1 Incorporação do Corante Vermelho Neutro (VN)	66
3.7.4.2 Redução do MTT	67
3.7.4.3 Conteúdo de Ácidos Nucleicos.....	67
3.8 Avaliação do Potencial Tóxico de GSNO e das Nanopartículas em Animais Induzidos à Queimadura Térmica	68
3.8.1 Animais.....	68
3.8.2 Padronização dos Grupos.....	68
3.8.3 Indução da Queimadura Térmica	69
3.8.4 Tratamento das Queimaduras e Coleta das Amostras.....	70
3.8.5 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos	70
3.8.6 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos.....	71
3.8.7 Concentração de Prata em Sangue e Órgãos.....	71
3.9 Avaliação do Potencial de Cicatrização de GSNO e das Nanopartículas nos Animais Induzidos à Queimadura	71
3.9.1 Redução das Lesões.....	71
3.9.2 Avaliação do Processo de Cicatrização	71
3.10 Análises Estatísticas	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 Síntese e Decomposição de S-Nitrosoglutationa (GSNO)	75

4.2 Caracterização das Nanopartículas	77
4.2.1 Nanopartículas de Alginato-Quitosana (AG/CS)	77
4.2.2 Nanopartículas de PCL Recobertas por Quitosana (PCL/CS)	79
4.2.3 Nanopartículas de PCL Recobertas por Quitosana (PCL/CS) e Contendo GSNO82	
4.2.4 Nanopartículas de Prata (AgNPs)	89
4.3 Avaliação do Potencial Citotóxico de GSNO e das Nanopartículas	95
4.3.1 S-Nitrosoglutationa.....	95
4.3.2 Nanopartículas de Alginato-Quitosana (AG/CS) Contendo GSNO	97
4.3.3 Nanopartículas de PCL Recobertas por Quitosana (PCL/CS) e Contendo GSNO	
.....	102
4.3.4 Nanopartículas de Prata (AgNPs)	108
4.4 Avaliação do Potencial Tóxico de GSNO Livre e das Nanopartículas em Animais	
Induzidos à Queimadura Térmica	113
4.4.1 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos	113
4.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos.....	123
4.4.3 Concentração de Prata em Sangue e Órgãos.....	129
4.5 Avaliação do Potencial de Cicatrização de GSNO Livre e das Nanopartículas nos	
Animais Induzidos à Queimadura.....	131
4.5.1 Redução do Diâmetro da Lesão.....	131
4.5.2 Avaliação do Processo de Cicatrização	132
5. CONCLUSÕES	139
6. PERSPECTIVAS	143
REFERÊNCIAS	147
ANEXOS	157
ANEXO A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GSNO	157
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	159
ANEXO C – ARTIGOS SUBMETIDOS/PUBLICADOS DURANTE A PESQUISA.....	163

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Queimaduras

Lesões não intencionais representam um problema de saúde pública e as queimaduras figuram entre as principais. De acordo com a Sociedade Internacional para Queimaduras (International Society for Burn Injuries – ISBI), queimadura é a destruição de parte ou de todas as células das camadas da pele por calor, produtos químicos, eletricidade, radiação ultravioleta (UV), infravermelha ou radioatividade; além de frio, fricção, plantas ou animais. Dentre as causas mais comuns, destacam-se as queimaduras por fogo/chama e por líquidos quentes (escaldaduras) (AMERICAN BURN ASSOCIATION, 2011). Basicamente, as queimaduras são classificadas de acordo com a profundidade da lesão, em três graus (Figura 1) (EVERS *et al.*, 2010):

- Queimadura de 1º grau superficial – acomete a camada superficial da pele (epiderme), sendo caracterizada por vermelhidão, inchaço e dor locais, úmida e sem formação de bolhas.
- Queimadura de 2º grau parcial superficial – acomete parte da camada profunda da pele (derme papilar), sendo caracterizada por dor mais intensa, formação de bolhas e desprendimento parcial ou total da área afetada.
- Queimadura de 2º grau parcial profunda – acomete totalmente a camada profunda da pele (derme reticular), sendo caracterizada por pouca dor, aspecto seco e esbranquiçado e perda dos apêndices epidérmicos (folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas).
- Queimadura de 3º grau profunda – acomete ambas as camadas da pele, o tecido subcutâneo (hipoderme) e as terminações nervosas (resultando em ausência de dor), sendo caracterizada por aspecto seco e esbranquiçado ou escurecido (carbonizado), dependendo da fonte de origem da lesão.

Alguns autores incluem ainda um 4º grau, na qual a pele é acometida além da hipoderme, danificando músculos, tendões e ossos, e prejudicando a estrutura e a função morfológica da pele (DeSANTI, 2005; HERMANS, 2005).

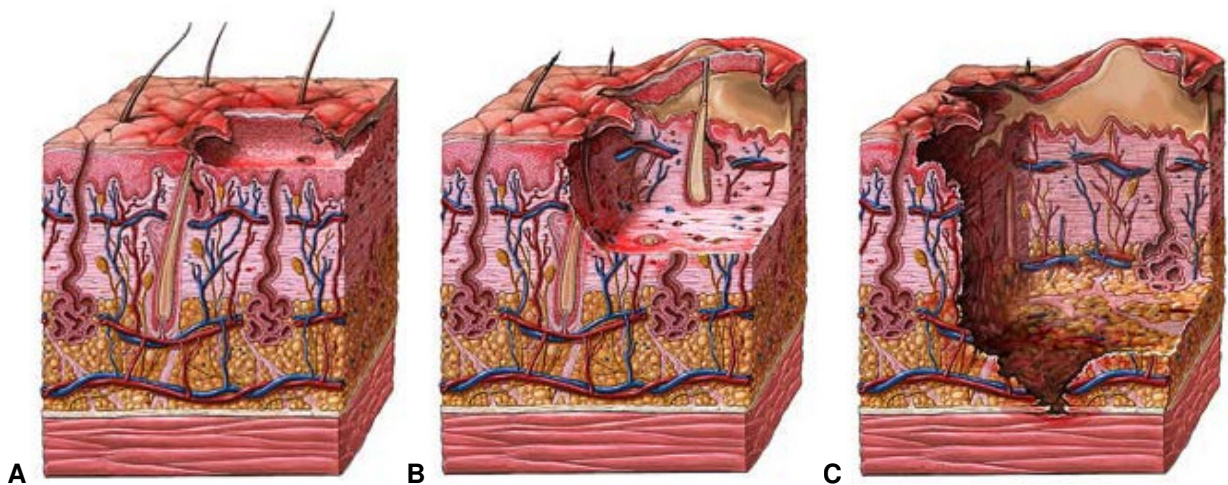


Figura 1 - Representação das camadas da pele acometidas conforme a profundidade da lesão. A – Queimadura de 1º grau. B – Queimadura de 2º grau. C – Queimadura de 3º grau. Fonte: A.D.A.M. Images.

Além da profundidade, a extensão da queimadura também constitui fator determinante para a morbidade (número de casos em um grupo populacional) e a mortalidade (número de mortes em um grupo populacional) de pacientes queimados. A extensão de uma queimadura pode ser rapidamente estimada calculando-se a porcentagem da área da superfície corporal total acometida pela queimadura, através da Regra dos Nove – a qual divide o corpo em segmentos de 9% ou múltiplos de 9% (Figura 2) (WALLACE, 1951). Para bebês e crianças com até 15 anos, a Regra dos Nove não é recomendada e pode resultar em estimativas imprecisas, uma vez que as proporções do corpo não são as mesmas – por exemplo, a cabeça corresponde a mais de 9% da superfície corporal e as extremidades inferiores, a menos de 9%. Neste caso, recomenda-se a utilização dos valores da Tabela de Lund-Browder, a qual leva em consideração as proporções do corpo em relação à idade a um valor pré-estabelecido (Figura 2) (LUND & BROWDER, 1944).

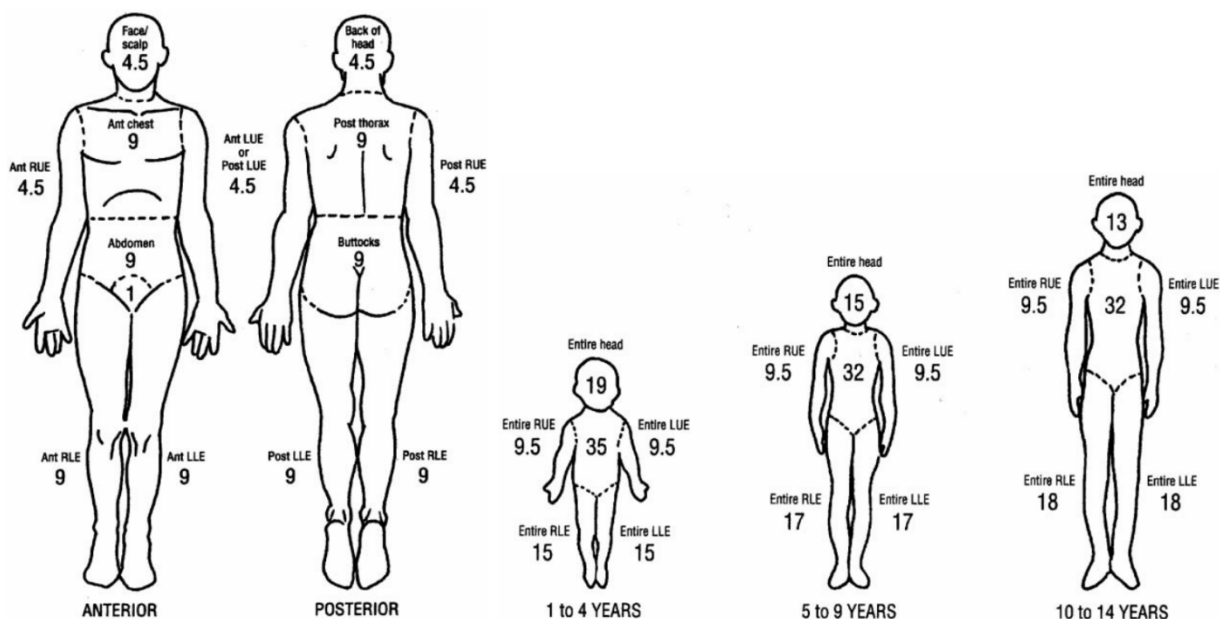


Figura 2 - Porcentagens utilizadas, em adultos e crianças, para cálculo da superfície corporal total acometida pela queimadura e estimativa de sua extensão. Fonte: Adaptado de CHURCH *et al.*, 2006.

No Brasil, estima-se que 77,3 mil pessoas morreram devido a lesões não intencionais em 2008. Deste total, 1,2 mil foram devido a lesões provocadas por incêndios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Em 2009, aproximadamente 2,8 mil pacientes com queimaduras foram atendidos em unidades públicas de saúde apenas no Estado de São Paulo, de acordo com dados da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP) (BRASIL, 2010). Ainda de acordo com os dados da SES-SP, a taxa de internações diárias por queimadura pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Estado foi de quase nove, apenas em 2010 (BRASIL, 2011). Dentre as internações por causas externas registradas no primeiro semestre de 2003, no Hospital Municipal de São José dos Campos, as queimaduras apresentaram o maior custo-dia: R\$ 130,18 (MELIONE & MELLO-JORGE, 2008). Estima-se que o SUS gaste anualmente cerca de R\$ 55 milhões com tratamentos de pacientes queimados (MACEDO *et al.*, 2012).

Queimaduras graves podem prejudicar consideravelmente a integridade da pele, levando à formação de cicatrizes hipertróficas e queloides. Juntamente com o

trauma do acidente e os processos dolorosos decorrentes do tratamento, as marcas deixadas pelas queimaduras acarretam em baixa autoestima e ansiedade social aos pacientes, contribuindo para o desenvolvimento de doenças durante e após a reabilitação. Um número considerável de pacientes apresenta doenças como depressão e transtorno de estresse pós-traumático após o acidente, não voltam a trabalhar e são passíveis de ressarcimento pelos sofrimentos psíquicos acarretados (GARDNER *et al.*, 2012).

1.2 Pele

As queimaduras estão entre as maiores causas de danificação cutânea. A pele – maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corpóreo total – é responsável por diversas funções no organismo, como proteção contra desidratação, atrito e invasão de microrganismos; envio de informações do ambiente externo ao sistema nervoso central (SNC); termorregulação e excreção de substâncias. Conseqüentemente, após uma queimadura grave, a perda de calor e de água aumenta, a sensibilidade e a elasticidade são perdidas e o risco de infecção é elevado (DeSANTI, 2005; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A pele é composta por duas camadas: **epiderme** (camada superficial, não vascularizada e constituída por tecido epitelial) e **derme** (camada profunda, ricamente vascularizada e constituída por tecido conjuntivo). Abaixo da derme encontra-se a hipoderme ou tecido subcutâneo, a qual não pertence à pele e serve-lhe apenas de união com órgãos adjacentes (Figura 3) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

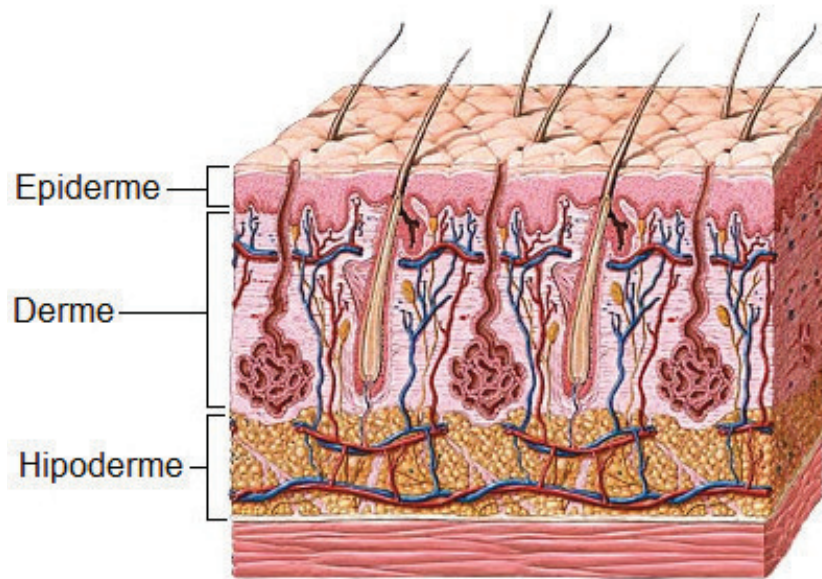


Figura 3 – Representação das camadas da pele e do tecido subcutâneo (hipoderme). Fonte: Adaptado de A.D.A.M. Images.

A epiderme é constituída por cinco camadas (da mais interna para a mais externa): **basal**, **espinhosa**, **granulosa**, **lúcida** e **córnea**. Na camada granulosa, os grânulos lamelares (que contêm discos lamelares formados por bicamadas lipídicas) são sintetizados e, posteriormente, seu material lipídico é depositado no espaço intercelular da camada córnea. Juntamente com os corneócitos (queratinócitos maduros) ali presentes, a deposição deste material contribui para a formação de uma barreira impermeável à água e contra a penetração de substâncias. Desta forma, a camada córnea atua como fator limitante para a penetração de agentes terapêuticos (FOLDVARI, 2000; GUTERRES *et al.*, 2007; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

A derme é rica em terminações nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos, mas basicamente acelular. É constituída por duas camadas: **papilar**, na qual estão presentes fibrilas de colágeno (que prendem a derme à epiderme) e pequenos vasos sanguíneos que nutrem e oxigenam a epiderme, e **reticular**, a qual também apresenta muitas fibras proteicas (colágeno e elastina), sendo responsável, juntamente com a camada papilar, pela elasticidade da pele. Epiderme e derme são unidas por um complexo de apêndices epidérmicos (folículos pilosos e glândulas sudoríparas e

sebáceas), cujos eixos são revestidos com células epiteliais. Por este motivo, a derme é capaz de produzir células epiteliais novas para a reposição da epiderme, como em casos de queimadura. Os apêndices epidérmicos, embora com capacidade limitada, podem ser utilizados como vias adicionais de absorção de fármacos (FOLDVARI, 2000; CHURCH *et al.*, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A hipoderme, por sua vez, é constituída basicamente por adipócitos (células que armazenam grandes quantidades de lipídeos) e desempenha funções de isolamento térmico, fornecimento de energia e absorção de choque (amortecimento).

1.3 Processo de Cicatrização

Quando a pele é lesionada, uma série de eventos celulares e moleculares é desencadeada visando à regeneração do tecido danificado e o restabelecimento da homeostasia. O processo de cicatrização depende de fatores como tipo de pele, localização anatômica, raça, sexo, idade, estado nutricional, oxigenação, infecção, doenças como diabetes, dentre outros (GUO & DiPIETRO, 2010); e é composto basicamente por três fases distintas, que devem ocorrer em sequência e tempo adequados: inflamação, regeneração e remodelação (Figura 4).

- Inflamação – imediatamente após a injúria do endotélio, a ruptura de vasos sanguíneos e linfáticos ativa plaquetas e componentes do plasma (fatores de coagulação), os quais formam um coágulo de fibrina que age como barreira contra a invasão de microrganismos e como matriz provisória para a migração celular de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A degranulação das plaquetas (liberação de fatores de crescimento contidos em seu citoplasma), juntamente com a ativação do sistema complemento e os produtos da degradação de bactérias, é responsável por recrutar os neutrófilos para o local da ferida – os quais possuem grande capacidade de fagocitose de bactérias e fungos. Após dois ou três dias, monócitos também são recrutados para o local da ferida e se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos são as principais células do processo de cicatrização e

atuam na remoção de bactérias, corpos estranhos e componentes do tecido lesado, além de secretarem fatores quimiotáticos e de crescimento essenciais à formação do tecido de granulação, o qual precede o desenvolvimento do tecido cicatricial maduro (ATHER *et al.*, 2007; GURTNER *et al.*, 2008).

- Fase proliferativa ou regenerativa – nesta fase, que acontece dois a dez dias após a lesão, queratinócitos (células produtoras de queratina) são estimulados para as margens da ferida, dando início à epitelização. Concomitantemente, fibroblastos atuam produzindo colágeno, elastina, fibronectina, proteases e glicosaminoglicana – substituindo a matriz provisória, composta por fibrina, pelo tecido de granulação. Igualmente essencial para a formação do novo tecido de granulação, a angiogênese também ocorre nesta fase, a partir da migração e da estimulação mitogênica de células endoteliais. Este processo é regulado por elementos presentes no soro e na matriz extracelular (principalmente fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento fibroblástico), importantes para o crescimento e a manutenção dos novos vasos sanguíneos (GABBIANI, 2003; ATHER *et al.*, 2007; GURTNER *et al.*, 2008).

- Fase reparativa ou de maturação – durante esta fase, iniciada duas a três semanas após a lesão, os eventos celulares e moleculares ativados após a lesão são gradativamente diminuídos, até cessarem por completo. Após abundante síntese e deposição de matriz extracelular (MEC), fibroblastos (pela ação do fator de transformação do crescimento beta – TGF- β) sofrem maturação e se transformam em miofibroblastos – células que expressam largos filamentos de actina abaixo da membrana plasmática, sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da MEC (a qual se reorganiza e passa de provisória à definitiva) e estendem pseudópodes que se prendem firmemente ao colágeno da MEC para realizar fortes movimentos de retração celular, promovendo a contração da ferida. Miofibroblastos, juntamente com macrófagos e células endoteliais, sofrem apoptose (morte celular programada) ou migram do local da ferida e deixam uma “massa” com poucas células e constituída principalmente por colágeno, proporcionando a formação de uma cicatriz normal. Se a cicatrização não progride de forma adequada e a celularidade local persiste, é formada uma cicatriz hipertrófica ou quelóide (ATHER *et al.*, 2007; GURTNER *et al.*, 2008).

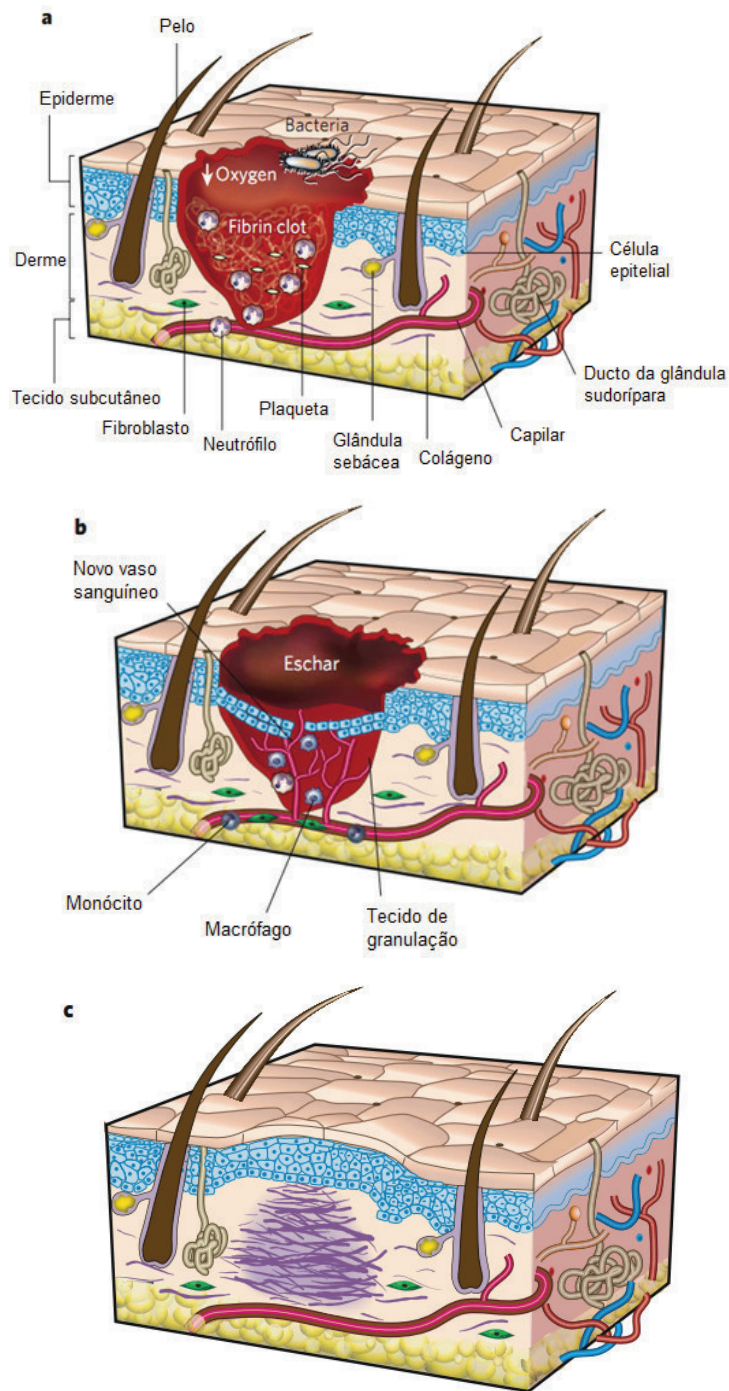


Figura 4 - Fases da cicatrização. Fase inflamatória (a): o ambiente da ferida é caracterizado por baixa oxigenação (hipóxia) e formação de um coágulo de fibrina. Bactérias, plaquetas e neutrófilos estão presentes em grande quantidade. Fase regenerativa (b): o ambiente da ferida é caracterizado pela formação de uma escara (crosta escura) na superfície da pele. Há início da formação do tecido de granulação e de novos vasos sanguíneos. Fase reparativa (c): miofibroblastos, macrófagos e células endoteliais sofrem apoptose ou deixam o local da ferida, proporcionando a formação de uma cicatriz normal. Fonte: Adaptado de GURTNER *et al.*, 2008.

1.4 Administração Tópica de Fármacos

Assim como os órgãos viscerais, a pele pode desempenhar diversas funções metabólicas. Dentre estas funções, destaca-se a biotransformação de fármacos, possível provavelmente devido à expressão, na pele, de importantes enzimas metabolizadoras de fármacos constituintes da família das citocromos P450 (enzimas metabolizadoras mais abundantemente encontradas no fígado); além de outras enzimas, como as esterases. Devido a essa capacidade e por se tratar de um método não invasivo, a pele tem sido cada vez mais explorada para administração de fármacos e vacinas, e para testes toxicológicos de fármacos e drogas (SVENSSON, 2009).

A administração tópica de fármacos depende das propriedades anatômicas da pele, das características físico-químicas do fármaco e do tipo de formulação. As substâncias podem permear as camadas da pele através de três vias: paracelular, transcelular e transanexal (Figura 5). A via paracelular é a mais comum; porém mais lenta, uma vez que as substâncias passam entre os corneócitos – ao contrário da transcelular que, embora seja mais curta, oferece maior resistência, uma vez que as substâncias precisam atravessar as estruturas lipídicas e o citoplasma de queratinócitos mortos (TROMMER & NEUBERT, 2006). A via transanexal, apesar de pouco significativa (os apêndices epidérmicos representam apenas 0,1% da superfície total da pele), também representa uma importante rota para administração de substâncias, como agentes protetores contra raios ultravioleta (UV) utilizados em protetores solares (LADEMANN *et al.*, 2004).

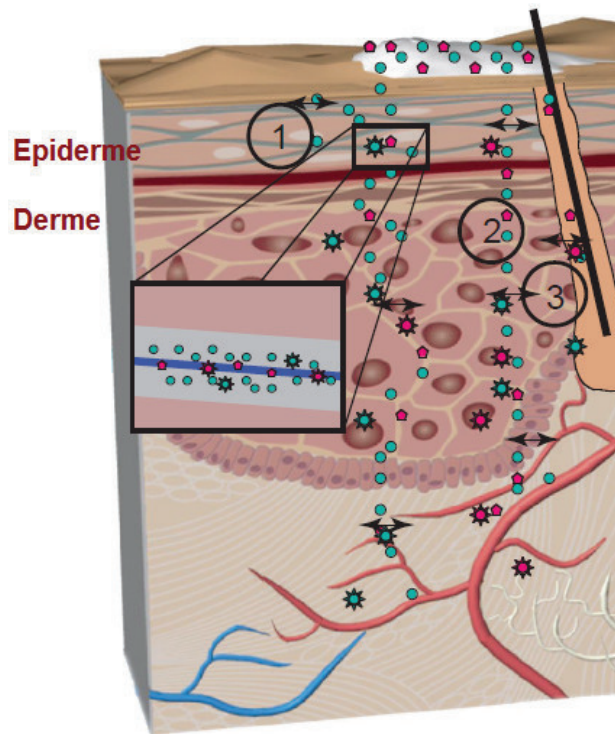


Figura 5 – Representação das possíveis vias de permeação de fármacos através das camadas da pele. 1 – Via paracelular: as substâncias passam entre os corneócitos. 2 – Via transcelular: as substâncias atravessam as estruturas lipídicas e o citoplasma de queratinócitos mortos. 3 – Via transanexal: as substâncias permeam as camadas da pele através dos apêndices epidérmicos. Fonte: Adaptado de FOLDVARI, 2000.

A utilização de agentes promotores de absorção e/ou de técnicas físicas pode auxiliar a permeação dos fármacos, diminuindo a limitação imposta pela camada córnea. Alguns exemplos são a interação entre os grupos polares do potenciador e dos lipídeos da camada córnea (resultando em perturbações que facilitam a difusão dos fármacos hidrofílicos); o aumento do fluxo de moléculas de água livres entre as bicamadas lipídicas, através de hidratação simples ou da utilização de ureia (resultando na hidratação da camada córnea e facilitando a difusão de fármacos hidrofílicos); e a utilização de técnicas de iontoforese (aplicação de corrente elétrica unidirecional, que gera um potencial iônico e aumenta a migração de fármacos iônicos através da repulsão eletrostática do eletrodo ativo), fonoforese (aplicação de ultrassom, que provoca a formação de bolhas de gás e, conseqüentemente, a formação de poros nos

corneócitos, aumentando o espaço intercelular e perturbando os lipídeos da camada córnea), eletroporação (aplicação de pulsos elétricos curtos, de alta voltagem, que provocam uma formação transitória de poros aquosos na bicamada lipídica, permitindo a difusão de macromoléculas através destes poros) e administração por microagulhas revestidas com o fármaco (liberado diretamente na corrente sanguínea), as quais penetram a camada córnea e toda a epiderme, sem alcançar as terminações nervosas presentes na derme superior (PRAUSNITZ *et al.*, 2004; TROMMER & NEUBERT, 2006; SILVA *et al.*, 2010).

1.5 Tratamento de Queimaduras

O tratamento de feridas na pele destina-se, principalmente, à prevenção e/ou diminuição do risco de infecção e à eliminação de fatores que possam desacelerar o processo de cicatrização, contribuindo para a formação de uma cicatriz quase imperceptível. Para tanto, os curativos utilizados devem manter a umidade no leito da ferida, permitir trocas gasosas, ser impermeáveis a bactérias e facilmente removíveis, para não causar traumas na ferida e na pele ao redor – minimizando a dor e proporcionando o máximo de conforto ao paciente. Além disso, devem ser confeccionados com materiais biocompatíveis para evitar rejeição e apresentar baixo custo, tornando sua utilização economicamente viável (HERMANS, 2005).

Como mencionado anteriormente, queimaduras graves acarretam em descompensação hídrica e tornam o organismo mais suscetível à infecção – quinta complicação clínica mais relevante decorrente de queimaduras e principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes queimados (FONG & WOOD, 2006; AMERICAN BURN ASSOCIATION, 2011). A grande exposição da pele ao meio ambiente torna seu contato constante e inevitável com microrganismos patogênicos, sendo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* os mais presentes em feridas por queimadura (GRUNWALD & GARNER, 2008; KASTEN *et al.*, 2011). Infecção persistente (mais de 14 dias) pode retardar a maturação epidérmica e contribuir para a formação de cicatrizes profundas (SINGER & MCCLAIN, 2002). Portanto, torna-se indispensável,

nos curativos utilizados, a presença de um agente antimicrobiano e de um material que contenha a perda dos fluidos corpóreos.

Atualmente, os produtos mais utilizados no tratamento de queimaduras são pomadas à base de sulfadiazina de prata (associada ou não ao nitrato de cério); hidrogéis e hidrocoloides; loções oleosas à base de ácidos graxos essenciais; gases impregnadas com Aloe vera; membranas de poliuretano, alginato de cálcio ou colágeno, e matrizes de regeneração dérmica (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Outras recentes tecnologias incluem cultura *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos, engenharia de tecidos e terapia gênica (ATIYEH *et al.*, 2005). Entretanto, devido à necessidade de trocas frequentes e à fabricação não nacional de alguns destes produtos, o custo para a utilização dos mesmos é elevado, tornando-os pouco acessíveis à população de baixa renda e economicamente inviáveis para utilização em larga escala nas Unidades de Terapia de Queimados. Assim, um dos grandes desafios das pesquisas na área de reparação tissular consiste no desenvolvimento de materiais que apresentem as características adequadas ao tratamento e que sejam produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo e fácil obtenção.

1.6 Nanotecnologia

A nanotecnologia tornou-se um dos alvos de pesquisa mais importantes dos últimos anos. Nanomateriais são materiais cujas estruturas encontram-se em escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) e cujas propriedades físico-químicas diferem das observadas em maior escala, possibilitando diferentes fenômenos e novas aplicações. Dentre os nanomateriais, destacam-se as nanopartículas, as quais têm atraído a atenção de pesquisadores, do governo e da indústria mundial devido à diversidade de sua aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e eletrônicos – uma vez que apresentam diferentes propriedades físico-químicas e possuem facilidade de preparo e manipulação, maior área superficial e elevada reatividade (JU-NAM & LEAD, 2008; DURÁN *et al.* 2009).

1.6.1 Nanopartículas de Prata

A prata é um metal cujas propriedades antimicrobianas são conhecidas pelo homem desde a Antiguidade (por volta de 4.000 a.C.). Egípcios, Gregos e Romanos utilizavam-na para cozinhar e preservar água e alimentos perecíveis. Organismos vivos como bactérias, algas e fungos, por serem capazes de reduzir íons metálicos ou de formar complexos insolúveis com íons metálicos na forma de nanopartículas, podem ser utilizados para a síntese de nanomateriais. A literatura sobre a utilização de microrganismos para produção intra- e extracelular de nanopartículas metálicas é bastante ampla (MUKHERJEE *et al.*, 2002; GERICKE & PINCHES, 2006; MANDAL *et al.*, 2006; VIGNESHWARAN *et al.*, 2007; BASAVARAJA *et al.*, 2008; MOHANPURIA *et al.*, 2008; THAKKAR *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

A utilização de fungos para síntese de nanopartículas de prata (aglomerados de átomos de prata com diâmetro entre 1 e 100 nm) é relativamente recente. Dentre a vasta gama de espécies existentes, *Fusarium oxysporum* destaca-se por reduzir rapidamente a prata quando exposto a uma solução contendo este metal, produzindo nanopartículas altamente estáveis (AHMAD *et al.*, 2003; SASTRY *et al.*, 2003; DURÁN *et al.*, 2007; GADE *et al.*, 2008). O possível mecanismo pelo qual são formadas as nanopartículas envolve a adição de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) a uma solução aquosa estéril previamente colocada em contato com a biomassa do *F. oxysporum* e posterior redução dos íons de prata (Ag^+) por agentes redutores, específicos deste fungo, liberados na solução aquosa (Figura 6) – indicando claramente que esta redução ocorre extracelularmente (DURÁN *et al.*, 2005). A síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por método biotecnológico é mais vantajosa que por métodos químicos, por ser economicamente mais viável, demandar menos energia, não utilizar produtos químicos tóxicos ao meio ambiente e produzir nanopartículas altamente estáveis e com diâmetros menores (VAIDYANATHAN *et al.*, 2009).

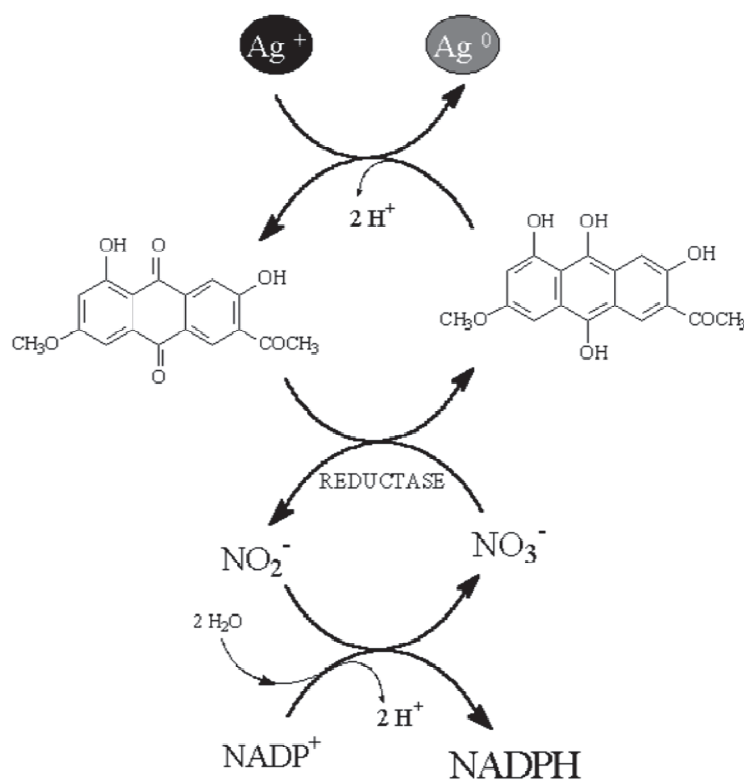


Figura 6 – Mecanismos hipotéticos da biossíntese extracelular de nanopartículas de prata (AgNPs) por agentes redutores específicos do *Fusarium oxysporum*. Fonte: DURÁN *et al.*, 2005.

Diversos estudos comprovam a elevada atividade antimicrobiana das AgNPs (FENG *et al.*, 2000; MORONES *et al.*, 2005; ATIYEH *et al.*, 2007; KVITEK *et al.*, 2011). Mesmo quando aplicadas em baixas concentrações, estas nanopartículas apresentam atividade bactericida eficiente e persistente, tornando sua utilização, em processos de desinfecção de materiais, mais vantajosa que desinfetantes químicos comumente utilizados, como o hipoclorito – que age mais rapidamente, mas requer concentrações mais elevadas e cuja atividade bactericida persiste por um tempo menor (CHAMAKURA *et al.*, 2011). Devido a essa propriedade, estas nanopartículas têm sido amplamente utilizadas em diversos produtos, como tecidos, vestimentas para hospitais, materiais cirúrgicos, curativos, colírios, produtos de higiene oral e pessoal, eletrodomésticos, embalagens para alimentos, no tratamento de água, dentre outros (FURNO *et al.*, 2004; JAIN & PRADEEP, 2005; LI *et al.*, 2006; DURÁN *et al.*, 2007; THERON *et al.* 2008;

KUMAR & YADAV, 2009; PRADEEP & ANSHUP, 2009; RAI *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2010; THAKKAR *et al.*, 2010; SAIFFUDIN *et al.*, 2011).

A associação de AgNPs a antibióticos é bastante interessante do ponto de vista médico e econômico, uma vez que potencializa o efeito antimicrobiano das nanopartículas, diminuindo os mecanismos de resistência dos microrganismos e os casos de infecção, conseqüentemente diminuindo os custos hospitalares decorrentes (LI *et al.*, 2005; GADE *et al.*, 2008). No âmbito do tratamento de feridas, curativos impregnados com AgNPs foram utilizados com sucesso em feridas crônicas (MISHRA *et al.*, 2008) e em lesões provocadas por queimaduras – nas quais, além da atividade antimicrobiana, modularam a produção de citocinas inflamatórias e aceleraram o processo de cicatrização (TIAN *et al.*, 2007). Curativos impregnados com prata nanocristalina também possuem alta eficácia no tratamento de feridas crônicas e queimaduras, reduzindo a inflamação e promovendo a cicatrização de forma menos tóxica que outros tipos de curativos contendo prata (FONG & WOOD, 2006; CHALOUPIKA *et al.*, 2010). Nesse sentido, AgNPs produzidas por método biotecnológico podem fornecer uma nova direção terapêutica para o tratamento de lesões provocadas por queimaduras, de maneira eficaz e economicamente viável.

1.6.2 Nanopartículas Poliméricas e Sistemas de Liberação Sustentada

Ao longo dos últimos anos, uma série de sistemas particulados (lipossomas, ciclodextrinas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas) tem sido utilizada como carreadores para administração de pequenas moléculas e agentes terapêuticos macromoleculares, em sítios de ação específicos (MOGHIMI *et al.*, 2012).

Nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores com diâmetro inferior a 1000 nm (1 μ m) e denominadas nanocápsulas ou nanoesferas de acordo com sua composição: a presença de óleo nas nanocápsulas é responsável pela formação de uma estrutura vesicular; enquanto que sua ausência, nas nanoesferas, é responsável pela formação de uma matriz polimérica sólida e homogênea. Em relação aos mecanismos de encapsulação, o fármaco ou as moléculas bioativas podem estar

retidos, dispersos ou dissolvidos dentro das nanopartículas, ou ainda adsorvidos à superfície das mesmas (Figura 7) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

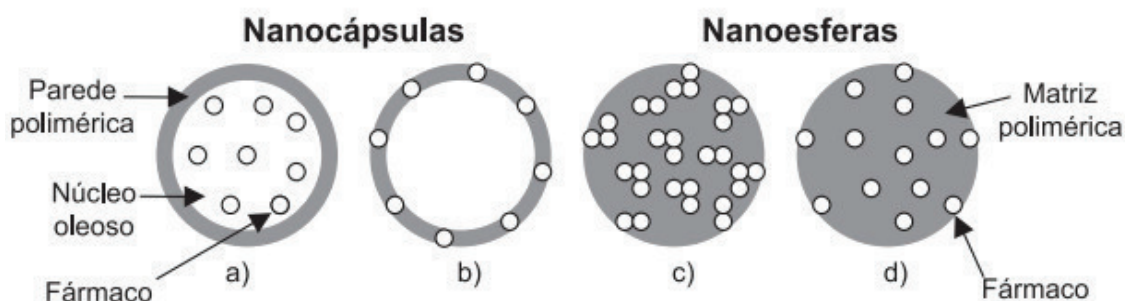


Figura 7 – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas poliméricas e possíveis disposições do fármaco nas mesmas: a) Fármaco dissolvido dentro da nanocápsula. b) Fármaco adsorvido à superfície da nanocápsula. c) Fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera. d) Fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica da nanoesfera. Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003.

A utilização de nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação de fármacos vem atraindo a atenção dos pesquisadores por proporcionar uma alternativa às terapias de longo prazo. Estes sistemas oferecem diversas vantagens em relação a outras vias de administração, como proteção do fármaco e sua liberação em um sítio específico, de forma contínua e sustentada; alta capacidade de atravessar barreiras fisiológicas e redução de administrações repetidas do fármaco – consequentemente reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos (DURÁN *et al.*, 2009). Através destes sistemas, a concentração do fármaco no sítio de ação é mantida na faixa terapêutica por um período maior de tempo, utilizando-se menor número de doses – uma vantagem em relação às formas convencionais de administração de fármacos, como gotas, sprays, injeções e comprimidos; nas quais a concentração do fármaco aumenta, atinge um pico máximo e declina (Figura 8).

Na administração convencional, são necessárias várias doses por dia para atingir e manter concentrações plasmáticas terapêuticamente eficazes, o que causa inconstâncias significativas nos níveis plasmáticos – podendo o nível do fármaco cair abaixo da concentração mínima eficaz ou exceder a concentração mínima tóxica; diminuindo o benefício terapêutico pretendido ou tornando-se um problema caso a dose

efetiva do fármaco esteja próxima à dose tóxica (PICOS *et al.*, 2000; SHEN, JASTI & LI, 2002; QURRAT-UL-AIN *et al.*, 2003).

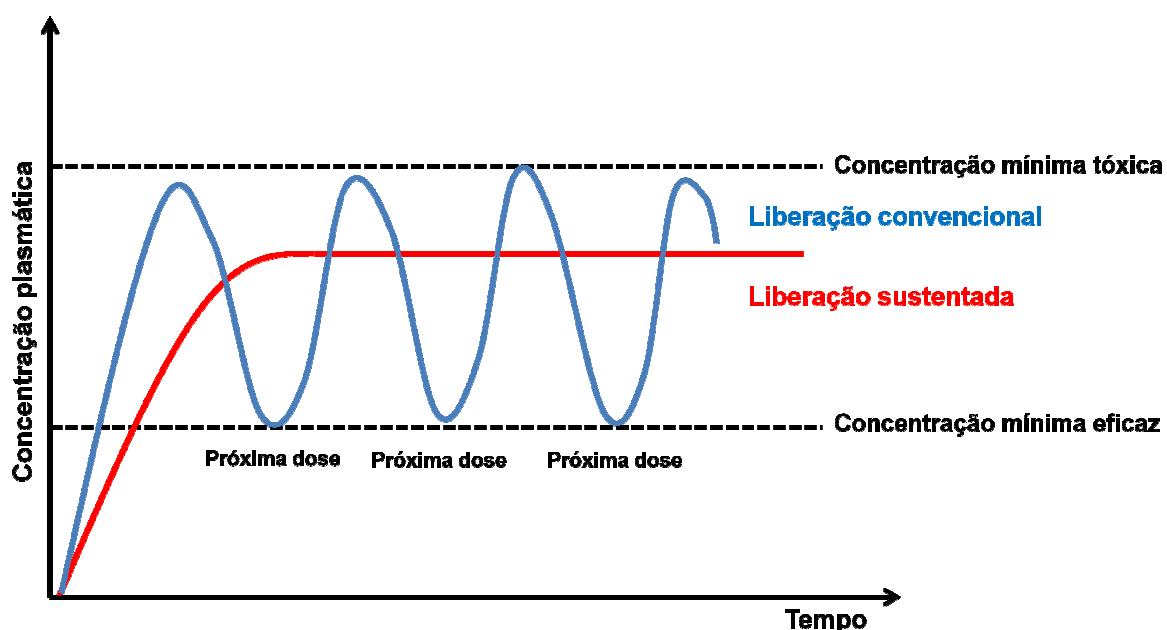


Figura 8 – Administração de fármacos convencional *versus* utilizando-se sistemas de liberação sustentada: a administração convencional necessita de várias doses para atingir e manter concentrações plasmáticas terapêuticamente eficazes, causando inconstâncias significativas que podem levar o nível do fármaco à abaixo da concentração mínima eficaz ou à acima da concentração mínima tóxica; enquanto sistemas de liberação sustentada mantêm a concentração plasmática do fármaco constantemente em níveis terapêuticos.

Os avanços na encapsulação de fármacos ou moléculas bioativas em nanopartículas poliméricas foram de grande valia para o desenvolvimento de novos produtos destinados ao tratamento de feridas, já que estas nanopartículas podem ser estáveis frente aos fluidos biológicos. A redução do tamanho das partículas a uma escala nanométrica, por si só, contribui para a permeação das mesmas pela pele. Outros fatores que influenciam a permeação e o transporte das nanopartículas, bem como a liberação das substâncias encapsuladas, são a composição química e a viscosidade das formulações, além do método utilizado para a encapsulação (GUTERRES *et al.*, 2007; MOGHIMI *et al.*, 2012). Na preparação de nanopartículas poliméricas para aplicações biomédicas, os polímeros (naturais ou sintéticos) devem

ser biocompatíveis, biodegradáveis e inócuos ao organismo. Alguns dos principais polímeros utilizados no desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados são os polihidroxicanoatos (PHA), a gelatina, o alginato e a quitosana, os quais são polímeros naturais, e os homopolímeros de ácido láctico (PLA) e de ácido glicólico (PGA), seus copolímeros (PLGA) e o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), os quais são polímeros sintéticos. O alginato e a quitosana são extensivamente empregados na indústria farmacêutica devido à sua elevada biocompatibilidade.

O alginato (um copolímero linear formado por blocos de grupos α -1,4-di-L-guluronato (G) e β -1,4-D-manuronato (M) – Figura 9) é um polissacarídeo extraído principalmente de algumas espécies marinhas de algas marrons, solúvel em água, atóxico e aprovado pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) (GEORGE & ABRAHAM, 2006). Na área médica, tem sido amplamente empregado no tratamento de úlceras com grande quantidade de exsudato, uma vez que a troca de íons entre o cálcio do alginato e o sódio da úlcera forma um gel de alginato de sódio estável à temperatura ambiente e com capacidade de absorção de umidade; mantendo, assim, um microambiente úmido apropriado à cicatrização. Ainda, a geração de íons livres de cálcio amplifica a cascata de coagulação e auxilia na fase de granulação tecidual. Outro aspecto positivo do uso de alginato em feridas é sua capacidade de bloquear terminações nervosas e de não se aderir ao leito da lesão, minimizando possíveis traumas locais (PAUL & SHARMA, 2004; GEORGE & ABRAHAM, 2006).

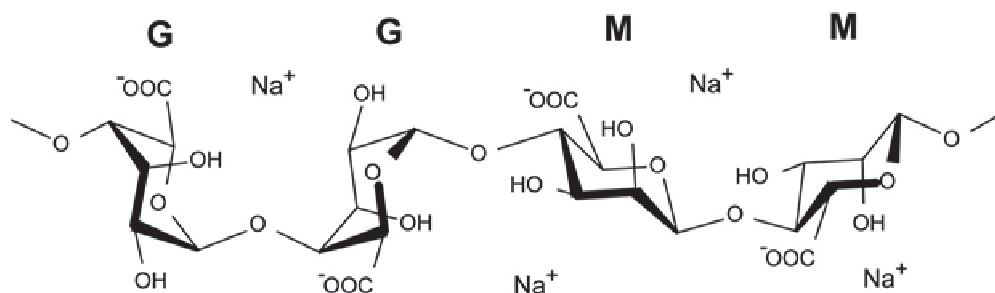


Figura 9 – Estrutura química do alginato. Fonte: MAGBIOMAT. Disponível em: <<http://www.physique.univ-paris-diderot.fr/magbiomat/img/alginate.png>>. Acesso em: 30 jan. 2013.

A quitosana é o segundo polímero mais abundante na natureza. É produzida através da desacetilação da quitina (Figura 10), principal componente estrutural do exoesqueleto de crustáceos – embora também encontrado em moluscos, insetos e na parede celular de fungos. O processo de desacetilação da quitina apresenta baixo custo e é facilmente realizado por hidrólise alcalina a altas temperaturas (GEORGE & ABRAHAM, 2006). Por serem biocompatíveis e biodegradáveis, estes dois polímeros são atualmente empregados em diversas áreas, tais como agricultura, indústria de alimentos, tratamento de efluentes, desenvolvimento de biomateriais, engenharia de tecidos e administração de fármacos (KHOUSHAB & YAMABHAI, 2010).

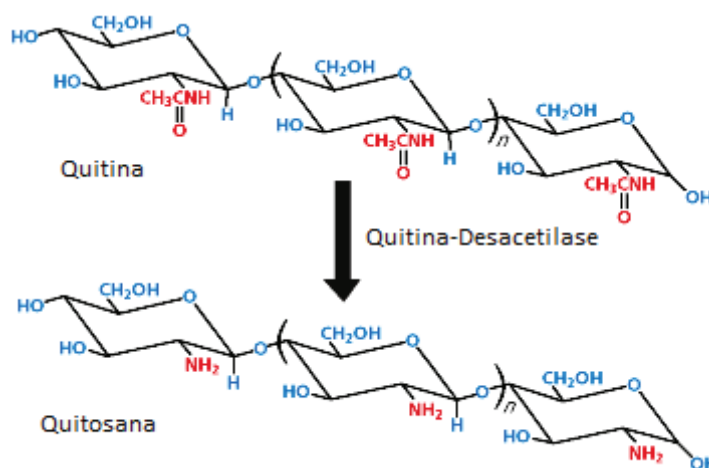


Figura 10 – Estrutura química da quitina e do produto de sua desacetilação, a quitosana. Fonte: Adaptado de Altakitin. Disponível em: <<http://www.altakitin.com/images/Chitosan1.gif>>. Acesso em: 30 jan. 2013.

No tratamento de feridas, a utilização da quitosana é muito promissora devido à sua permeabilidade ao oxigênio e às suas propriedades antimicrobiana, analgésica e cicatrizante (OKAMOTO *et al.*, 2002; KHOUSHAB & YAMABHAI, 2010; DAI *et al.*, 2011). A quitosana acelera o processo de cicatrização através da ativação de macrófagos e fibroblastos, e do aumento da síntese de ácido hialurônico e de sua deposição no tecido conjuntivo regenerado; além de influenciar na deposição de colágeno na matriz extracelular durante a reparação do tecido lesionado, dentre outros benefícios (Figura 11) (MI *et al.*, 2003; SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003; PAUL &

SHARMA, 2004). Diversos estudos já foram realizados sobre o emprego de quitosana sob a forma de filmes para recobrimento (membranas), hidrogéis, soluções coloidais ou esponjas para aplicação em feridas (MI *et al.*, 2001; LIN-GIBSON *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; DAI *et al.*, 2009; JAYAKUMAR *et al.*, 2011).

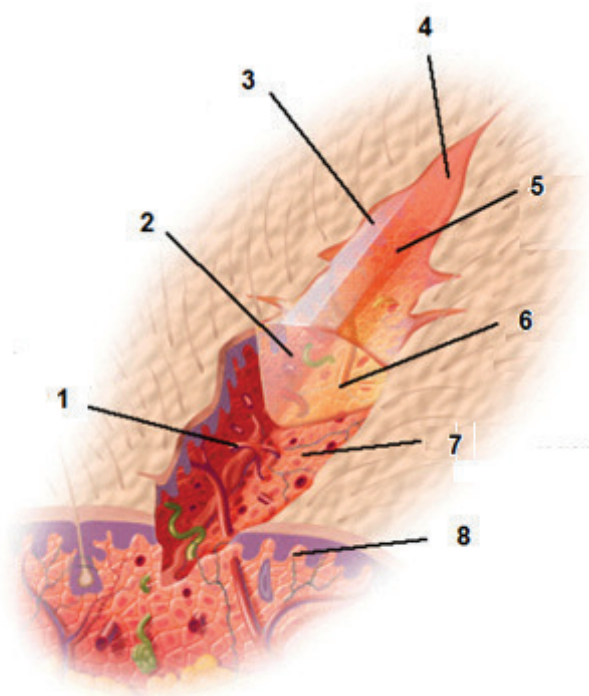


Figura 11 – Representação esquemática dos benefícios de curativos à base de quitosana. 1 – Estimulam a coagulação natural do sangue. 2 – Formam uma barreira contra infecção. 3 – Proporcionam suporte para o crescimento celular. 4 – Minimizam cicatrizes. 5 – Fortalecem o novo tecido formado. 6 – Fornecem proteínas necessárias à cicatrização. 7 – Absorvem os fluidos da inflamação. 8 – Bloqueiam terminações nervosas, reduzindo a dor. Fonte: Adaptado de PAUL & SHARMA, 2004.

Outra importante propriedade da quitosana para a área médica é a bioadesão – em pH fisiológico, devido aos grupos amino protonados, a quitosana apresenta carga positiva, a qual lhe confere capacidade de adesão a superfícies carregadas negativamente (como pele e mucosas), aumentando sua retenção. Além disso, é capaz de induzir uma abertura temporária nas junções epiteliais, podendo aumentar a permeabilidade de fármacos, especialmente os polares (BERGER *et al.*, 2004; NAGPAL *et al.*, 2010). A quitosana também pode ser associada à nanopartículas

de prata, potencializando o efeito antimicrobiano e inibindo o crescimento *in vitro* e *in vivo* de bactérias e fungos – provavelmente devido à permeabilização das células bacterianas pela quitosana, permitindo melhor penetração dos íons de prata (ONG *et al.*, 2008; MADHUMATHI *et al.*, 2010; TRAN *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2011).

Quando utilizados em conjunto, as propriedades do alginato e da quitosana podem ser melhores em relação às propriedades destes polímeros isolados. Por se tratarem de polieletrólitos de cargas opostas (quando em solução, o alginato pode apresentar carga líquida negativa enquanto a quitosana, carga líquida positiva), a associação destes polímeros forma um complexo polieletrólítico (PEC) com menor tendência ao intumescimento, em relação ao alginato, e maior resistência à solubilização em valores baixos de pH, em relação à quitosana (WANG *et al.*, 2001; HEIN *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2008; SÆTHER *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009). O comportamento do PEC de alginato-quitosana varia conforme o pH: quando muito baixo ou muito alto, a interação entre os polímeros é desfavorecida pela preponderância de ionização dos polímeros isolados. O valor ideal de pH para a formação de um PEC estável é em torno de 5,28 – valor intermediário aos valores de pKa do alginato (3,38 para os grupos M e 3,65 para os grupos G) e da quitosana (6,3 a 7,0) – garantindo que o alginato esteja desprotonado e a quitosana, potencialmente protonada (CÁRDENAS *et al.*, 2003; KARAKEÇILI *et al.*, 2007; SÆTHER *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009).

Alginato e quitosana associados têm sido amplamente empregados como sistemas carreadores de proteínas e DNA, e como sistemas para administração de vacinas, antibióticos, insulina e antineoplásicos (BORGES *et al.*, 2005; GEORGE & ABRAHAM, 2006; SARMENTO *et al.*, 2007; MOTWANI *et al.*, 2008; GAZORI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2011; NAGARWAL, KUMAR & PANDIT, 2012). Esta associação pode, ainda, atuar de maneira positiva na absorção dos fluidos de lesões exsudativas. Por serem renováveis e possuírem grande disponibilidade comercial e propriedades intrínsecas de biocompatibilidade, biodegradabilidade e cicatrização, estes dois polímeros associados tornam-se um biomaterial ideal para estudos e confecção de curativos destinados à cicatrização de feridas.

O PCL (Figura 12) é um polímero altamente biocompatível e biodegradável, cujas propriedades mecânicas, inocuidade de seu produto de degradação e grande permeabilidade a diversos fármacos têm atraído a atenção dos pesquisadores para fabricação de materiais implantáveis de utilização em longo prazo e preparação de sistemas nanoparticulados para liberação controlada de fármacos, uma vez que sua degradação é lenta (RÉ *et al.*, 2006; CIRPANLI *et al.*, 2010; CHUENJITKUNTAWORN *et al.*, 2010; KUMARI *et al.*, 2010; BYUN *et al.*, 2011a; BYUN *et al.*, 2011b; MAHAPATRO & SINGH, 2011).

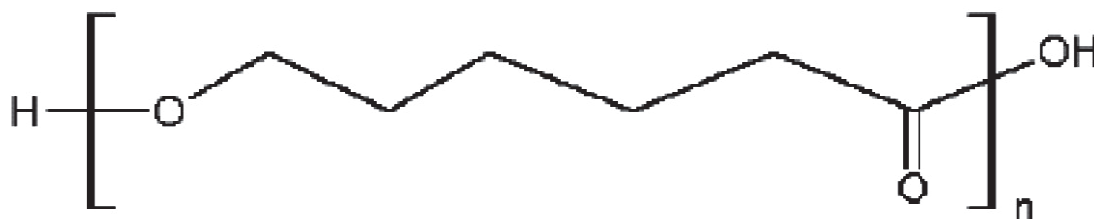


Figura 12 – Estrutura química do poli(ε-caprolactona) (PCL). Fonte: MAHAPATRO & SINGH, 2011.

O recobrimento de nanopartículas de PCL com quitosana proporciona uma maior permanência das nanopartículas em superfícies mucosas, conseqüentemente prolongando a liberação do princípio ativo encapsulado – tornando estas nanopartículas um promissor sistema para administração de fármacos e carreamento de macromoléculas (HAAS *et al.*, 2005; BILENSOY *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2011; WANG & PENG, 2011; YUAN, NAGUIB & WU, 2011; ERDOGAR *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; MAZZARINO *et al.*, 2012). Na área de reparo e regeneração de tecidos, nanofibras de PCL contendo quitosana foram empregadas com sucesso na formação de *scaffolds* (suportes) para engenharia de tecidos neurais e ósseos (CAO, LIU & CHEW, 2009; YANG, CHEN & WANG, 2009; SASMAZEL, 2011).

1.7 S-Nitrosoglutathione

O óxido nítrico (NO) é um radical livre com propriedades antimicrobiana, antioxidante e antitumoral, e de grande importância na regulação de processos fisiológicos e patofisiológicos (SEABRA *et al.*, 2004a; DE SOUZA *et al.*, 2006; AMADEU *et al.*, 2007; SEABRA *et al.*, 2007; AMADEU *et al.*, 2008; SEABRA *et al.*, 2008; SIMPLICIO *et al.*, 2010; STEVENS *et al.*, 2010; WINK *et al.*, 2011). Devido ao seu tamanho reduzido, alta lipofilicidade e ausência de carga, possui alta capacidade de difusão através das membranas celulares e de interação direta com alvos intracelulares (IGNARRO, 1999; LOOMS *et al.*, 2002).

O NO é sintetizado a partir da conversão de L-arginina a L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual possui três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). As duas primeiras, presentes em células endoteliais e neuronais, respectivamente, são cálcio-dependentes e produzem pequenas quantidades de NO; enquanto a terceira, presente em diversos tipos celulares, é independente de cálcio e produz quantidades maiores (SEABRA & DURÁN, 2012). Na pele, o NO é sintetizado continuamente por diversos tipos celulares, tais como queratinócitos, melanócitos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e células de Langerhans (Figura 13).

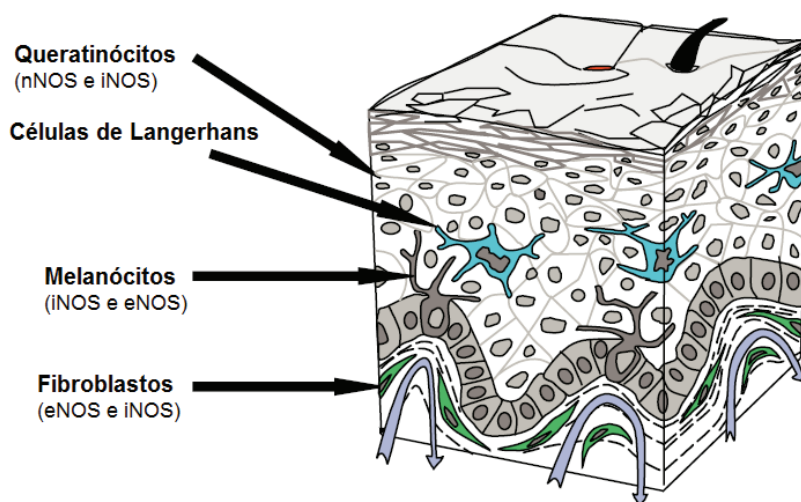


Figura 13 - Principais tipos celulares responsáveis pela síntese de óxido nítrico (NO) e respectivas isoformas da enzima NO sintase (NOS) atuantes nestas células. Fonte: CALS-GRIERSON & ORMEROD, 2004.

As isoformas endotelial e neuronal são responsáveis por manter a homeostase cutânea, através da regulação do fluxo sanguíneo; enquanto a induzível é produzida sob condições de estresse (como exposição à radiação UV e a microrganismos infecciosos) e está relacionada à defesa imune, imunorregulação e diferenciação (BRUCH-GERHARZ, RUZICKA & KOLB-BACHOFEN, 1998; CALS-GRIERSON & ORMEROD, 2004). Na cicatrização de feridas, o NO participa de diversos eventos, incluindo angiogênese, quimioatração de monócitos e neutrófilos, controle da síntese e deposição de colágeno, proliferação celular e apoptose (LUO & CHEN, 2005; AMADEU *et al.*, 2007; AMADEU *et al.*, 2008).

A produção excessiva inapropriada de NO pode ocasionar uma série de patologias, tais como doenças reumáticas, diabetes, isquemia cerebral e choque séptico; enquanto que a produção insuficiente pode ocasionar hipertensão, aterosclerose, disfunção erétil, dentre outras – tornando relevantes estudos tanto sobre o desenvolvimento de inibidores específicos de isoformas da NOS (regulando a produção de NO), quanto de compostos que liberem NO sob condições específicas. Como o NO está envolvido no processo de cicatrização de feridas, uma redução na produção de NO no local pode retardar e/ou prejudicar este processo – como observado no estudo de Amadeu & Costa (2006); no qual um decréscimo na produção de NO no leito das feridas, causado por *knockout* do gene ou por inibição farmacológica, ocasionou um retardo na cicatrização – evidenciado pelo aumento do tempo de fechamento das feridas, menor força de ruptura e diminuição da deposição de colágeno. Por outro lado, a suplementação com L-arginina (substrato para síntese de NO), juntamente com a utilização de um doador de NO endógeno, auxilia no fechamento das feridas (LUO & CHEN, 2005; VAREDI *et al.*, 2009).

A melhoria do processo de cicatrização de feridas pode, então, ser obtida através da aplicação tópica de materiais adequados, que liberem NO em quantidades terapêuticas, por um período de tempo prolongado e sem causar efeitos indesejados. Diversos doadores de NO têm sido empregados na terapêutica de doenças das mais variadas etiologias, tais como doenças cardiovasculares e respiratórias, osteoporose, mal de Alzheimer e incontinência urinária (BURGAUD, RIFFAUD & SOLDATO, 2002).

No tratamento de feridas, estudos sobre a aplicação tópica de doadores de NO em leishmaniose cutânea, ulceração crônica de perna e infecção de feridas em pacientes com diabetes ou doença vascular periférica mostraram efeitos benéficos e promissores (DAVIDSON *et al.*, 2000; HARDWICK *et al.*, 2001; MASTERS *et al.*, 2002; SCHEWENTKER *et al.*, 2002; YUEN, BAKER & RAYMAN, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2006). Polímeros como poliuretano, polimetacrilato e policloreto de vinilo, contendo doadores de NO, também se mostraram eficazes na prevenção contra a adesão de bactérias, na agregação plaquetária e na promoção do crescimento de células endoteliais quando utilizados para revestimento de dispositivos médicos (DOBMEIER & SCHOENFISCH, 2004; NABLO & SCHOENFISCH, 2004; REYNOLDS, FROST & MEYERHOFF, 2004; ZHOU & MEYERHOFF, 2005).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamina, cisteína e glicina (Figura 14), que atua principalmente na biotransformação e eliminação de xenobióticos, na proteção dos componentes intracelulares contra danos oxidativos e na desintoxicação por íons de metais pesados no organismo.

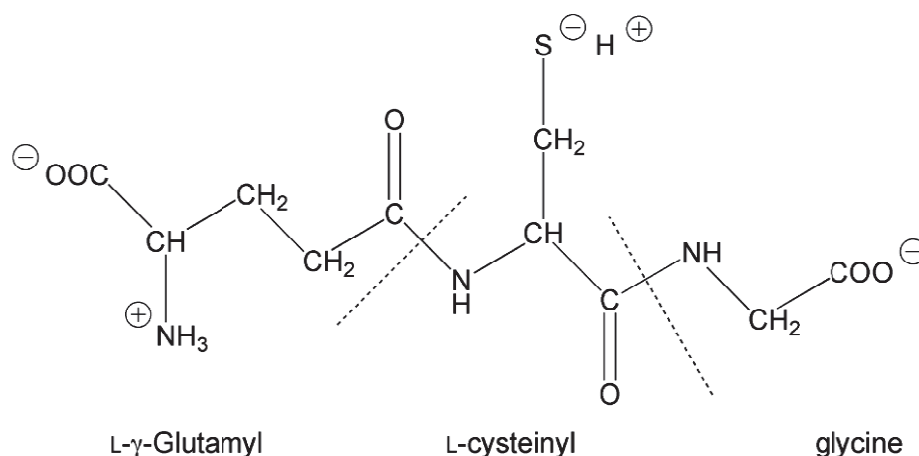


Figura 14 - Estrutura química da glutatona (GSH). Fonte: LASH, 2006.

A atividade protetora da GSH é mediada por sua oxidação à glutatona dissulfeto (GSSH). Para que esta atividade seja mantida, a GSH deve ser regenerada;

processo que ocorre através de um ciclo envolvendo três enzimas: glutatona oxidase (GO), glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona redutase (GR) – esta última, responsável pela regeneração da GSH e um dos principais alvos de estudo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos (HUBER, ALMEIDA & DE FÁTIMA, 2008). A associação de GSH a NO origina um composto denominado S-Nitrosoglutatona (GSNO) (Figura 15), um doador endógeno de NO da classe dos S-Nitrosotióis (RSNOs) – compostos orgânicos contendo um grupo nitroso (NO) ligado ao átomo de enxofre de um tiol (-SH). A decomposição do GSNO, e consequente liberação de NO, ocorre através da clivagem da ligação S-NO; induzida por calor, luz UV, certos íons metálicos, radical superóxido ou compostos de selênio (WANG *et al.*, 2002).

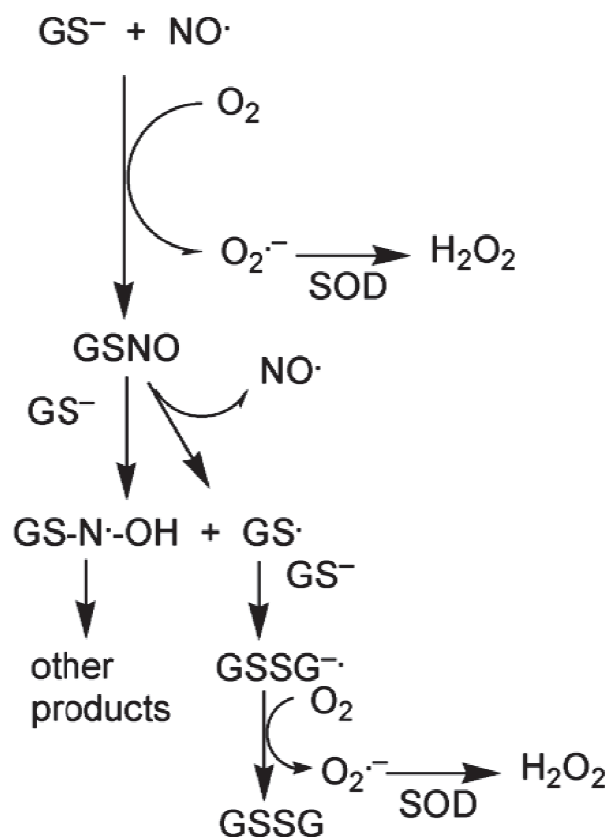


Figura 15 – Reações pelas quais a glutatona (GSH) reage com o óxido nítrico (NO) para formar S-Nitrosoglutatona (GSNO): GSH reage com NO na presença de oxigênio (O_2) e forma GSNO; que, por sua vez, pode liberar NO ou reagir formando espécies capazes de realizar a glutatonação de grupos sulfidril de proteínas. Fonte: LASH, 2006.

Estudos mostraram que o GSNO inibe a agregação plaquetária e atua de maneira benéfica no tratamento do infarto agudo do miocárdio e angina instável, na pré-eclampsia e em lesões de isquemia-reperfusão; além de desencadear a deposição de colágeno durante o processo de reparação de feridas cutâneas (LANGFORD *et al.*, 1994; DE BELDER *et al.*, 1995; LANGFORD, WAINWRIGHT & MARTIN, 1996; ACHUTH *et al.*, 2005). S-Nitrosotióis são, em sua grande maioria, solúveis em água; podendo ser incorporados em veículos hidrofílicos para aplicação tópica (AMADEU *et al.*, 2007). Quando associado à hidrogéis e aplicado topicamente, a liberação de NO a partir de GSNO aumentou o fluxo sanguíneo em pele humana saudável, encurtou o processo de reparação de feridas cutâneas em ratos (acelerando a fase inflamatória e auxiliando na contração e na reepitelização das feridas) e melhorou significativamente a cicatrização de feridas isquêmicas (SEABRA *et al.*, 2004a; AMADEU *et al.*, 2007; GEORGII *et al.*, 2011).

Levando-se em conta a necessidade de liberação do NO sob condições específicas, visando ao tratamento de patologias decorrentes da produção insuficiente deste composto, a liberação sustentada proporcionada pela nanotecnologia é bastante vantajosa e relevante. Diversos nanomateriais têm sido preparados e caracterizados para liberação de NO em aplicações biomédicas, tais como lipossomas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas (STASKO & SCHOENFISCH, 2006; HUANG *et al.*, 2009; JOHNSON *et al.*, 2010; SEABRA & DURÁN, 2010). A encapsulação de GSNO em nanopartículas poliméricas pode aumentar a estabilidade e a eficácia do composto, proporcionando liberação de NO de maneira sustentada em sítios de ação específicos. Até o momento, não há estudos na literatura compreendendo o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo GSNO para aplicação tópica em lesões provocadas por queimaduras. Sendo assim, neste estudo foram desenvolvidos dois diferentes sistemas nanoparticulados para administração tópica e liberação sustentada de GSNO (nanopartículas de alginato-quitosana e nanopartículas de PCL recobertas por quitosana); além de nanopartículas de prata produzidas extracelularmente por método biológico utilizando-se o fungo *Fusarium oxysporum*.

1.8 Avaliação de Efeitos Tóxicos *In Vitro*

Nanopartículas são passíveis de causar citotoxicidade por aderirem à membrana celular e por sofrerem degradação, conseqüentemente liberando produtos tóxicos. Outro mecanismo pelo qual podem induzir citotoxicidade é através de sua internalização pelas células, degradação intracelular e subsequente efeitos tóxicos dentro das células (PARDEIKE *et al.*, 2009). Portanto, nanopartículas podem apresentar riscos à saúde e ao meio ambiente – especialmente devido ao seu tamanho e sua capacidade de dispersão – tornando-se essenciais estudos que investiguem sua biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade (QUINA, 2004; SEATON & DONALDSON, 2005).

Para avaliar a segurança de uma nova formulação, testes *in vitro* são necessários, os quais podem ser realizados utilizando-se diferentes linhagens celulares (LEWINSKI *et al.*, 2008). Embora a Organização Internacional para Padronização (International Organization for Standardization) ISO 10993 exija que ensaios de citotoxicidade *in vitro* sejam os primeiros testes realizados para a avaliação da biocompatibilidade de uma nova substância, normalmente os países desenvolvidos são os únicos a realizá-los, salvo algumas exceções como o Brasil (ROGERO *et al.*, 2003). Esta avaliação através de cultura de células é de grande valia na investigação das características toxicológicas de substâncias e formulações (MELO *et al.*, 2004).

Das várias linhagens celulares, destacam-se as células V79, provenientes de fibroblastos de pulmão de Hamster Chinês – um tipo celular amplamente empregado na avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade (KATZER *et al.*, 2002; PFUHLER & WOLF, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2008; GHOSH & GIRIGOSWAMI, 2008; HAN *et al.*, 2009) por possuir elevada velocidade de proliferação e eficiência de clonagem, cariótipo estável e manutenção de suas propriedades iniciais após criopreservação (RODRIGUEZ & HAUN, 1999). Em decorrência dessas propriedades, tais células têm sido utilizadas para avaliar a toxicidade de novas formulações cosméticas, matérias primas, pesticidas, fármacos e resíduos tóxicos em geral (RODRIGUEZ & HAUN, 1999; MELO *et al.*, 2000; GIMENEZ *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2009;

OLIVEIRA *et al.*, 2009). Os resultados determinados nesta linhagem celular asseguram a avaliação da toxicidade do composto sem a metabolização pela via do sistema citocromo P450. Embora existam algumas limitações na determinação da toxicidade em células V79, a avaliação dos resultados destes testes é muito reprodutível (FRESHNEY, 1994; CAMARGO *et al.*, 2009), sendo possível estabelecer relações entre citotoxicidade e toxicidade aguda oral em animais experimentais, e determinar valores de dose letal 50 (DL₅₀) através desta via (HALLE & SPIELMANN, 1992; RODRIGUEZ & HAUN, 1999). Considerando-se que o fígado é o órgão mais atingido pela ação tóxica de várias substâncias e por possuir grande importância na manutenção da homeostasia, se faz necessária a análise do perfil hepatotóxico de fármacos e xenobióticos em geral para que haja uma segura utilização dos mesmos. A técnica da cultura primária de hepatócitos é amplamente difundida e utilizada em estudos nas áreas de farmacologia, toxicologia e bioquímica (RODRIGUEZ & HAUN, 1999; MELO *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2003a; MELO *et al.*, 2006; TUSHI *et al.*, 2009). Atualmente, estas células podem ser isoladas de diversas espécies de animais, e este sistema *in vitro* possibilita a realização de estudos de toxicidade, biotransformação, farmacocinética, mecanismo de ação toxicológica e farmacológica de substâncias químicas e biológicas, entre outros (GEBHARDT *et al.*, 2003; DOBBINS *et al.*, 2008).

1.8.1 Testes de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para a definição da citotoxicidade basal, assim como para o estabelecimento do intervalo de concentração no qual o agente tóxico atua. Detalhes importantes sobre os parâmetros citotóxicos envolvidos – como genotoxicidade, indução de mutações ou morte celular programada – são determinados neste tipo de teste. Com o estabelecimento da dose onde 50% das células são afetadas (IC₅₀), é possível comparar quantitativamente a resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas ou de vários compostos em um único sistema (EISENBRAND *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2003a; MONTEIRO-RIVIERE *et al.*, 2009). Os alvos (*endpoints*) celulares dos testes de citotoxicidade são baseados, principalmente,

na perda da permeabilidade seletiva celular, na redução da função mitocondrial e nas mudanças na morfologia e na replicação celular. Estes testes apresentam grande vantagem em relação aos testes *in vivo* devido ao custo reduzido, controle das variáveis do experimento e rapidez na obtenção dos resultados. Devido a essas características, os ensaios *in vitro* direcionam os testes *in vivo*, mostrando, por exemplo, qual organela mais afetada e que, conseqüentemente merece maior atenção e também direcionando quase que precisamente os valores de DL₅₀, mostrando cada vez mais sua grande reprodutibilidade. Os biomarcadores celulares dos testes de citotoxicidade são baseados, principalmente, na perda da permeabilidade seletiva celular, na redução da função mitocondrial, nas mudanças na morfologia e replicação celular. Um dos exemplos de teste de permeabilidade celular é que avalia a incorporação do corante Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenanzina). Esse teste consiste na habilidade de células viáveis incorporarem e ligarem ao corante. Sua característica ligeiramente catiônica permite ao corante penetrar na membrana celular por difusão passiva não – iônica, concentrando-se nos lisossomas, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos (REPETTO & SANZ *et al.*, 1993). A avaliação da viabilidade é feita espectroscopicamente, sendo a quantidade de células viáveis diretamente proporcional à absorbância da amostra. O teste de redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium)] avalia a viabilidade mitocondrial, uma vez que é reduzido pelas mitocôndrias viáveis, formando um precipitado insolúvel em água, o formazan. A avaliação da viabilidade, assim como do vermelho neutro, é feita espectroscopicamente e também é diretamente proporcional à absorbância, sendo o formazan diluído em álcool absoluto (DENIZOT & LANG *et al.*, 1986). Já o ensaio de quantificação de ácidos nucleicos permite uma determinação direta do número de células (AYOAMA *et al.*, 2000).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Considerando-se o grande potencial de sistemas nanoparticulados para administração sustentada de fármacos, suas vantagens em relação aos sistemas de administração convencionais, a escassez de trabalhos na literatura avaliando a toxicidade de nanomateriais (PASCHOALINO *et al.*, 2010) e a ausência de trabalhos empreendendo aplicação tópica de nanopartículas poliméricas com ou recobertas por quitosana e contendo GSNO para tratamento de queimaduras, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* destas nanopartículas e de nanopartículas de prata, bem como o potencial de cicatrização das nanopartículas em modelo *in vivo* de queimadura térmica.

2.1 Objetivos Específicos

- Síntese, caracterização e decomposição de S-Nitrosoglutationa (GSNO);
- Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas (alginato-quitosana e PCL recobertas por quitosana) contendo GSNO;
- Avaliação da eficiência de encapsulação do GSNO nas nanopartículas;
- Síntese e caracterização de nanopartículas de prata produzidas extracelularmente por método biotecnológico utilizando-se o fungo *Fusarium oxysporum*;
- Avaliação dos efeitos tóxicos *in vitro* de GSNO (livre e encapsulado), nanopartículas poliméricas e nanopartículas de prata em cultura de células de linhagens pré-estabelecidas (V79 e 3T3) e em cultura primária de hepatócitos;
- Avaliação dos efeitos tóxicos *in vivo* e do potencial de cicatrização de GSNO (livre e encapsulado) e de nanopartículas de prata em animais submetidos à queimadura térmica.

*Materials e
Métodos*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese e Decomposição de S-Nitrosoglutationa (GSNO)

O GSNO foi sintetizado através de reação de S-Nitrosação direta de glutatona (GSH), de acordo com protocolo estabelecido por Hart (1985). Para tanto, 1,5 g de glutatona (Sigma® G4251 ≥ 98,0%) foram dissolvidos em 8 mL de HCl 0,5 M e misturados a uma quantidade equimolar (0,3 g) de NaNO₂. A solução foi mantida em banho de gelo (~4°C) durante 40 minutos, sob agitação magnética e proteção da luz. Em seguida, ainda sob as mesmas condições, foram adicionados 10 mL de acetona, mantendo-se a agitação por mais 10 minutos. O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado cinco vezes com 5 mL de água destilada, seguido de 5 mL de acetona por três vezes e 1 mL de éter etílico. Todos os solventes utilizados no processo de lavagem do precipitado estavam gelados. Após as lavagens, o sólido retido da filtração foi colocado em um tubo tipo Falcon, seco em liofilizador (Terroni® 3000 TT) por 24 horas e armazenado em freezer (-20°C), sob proteção da luz. A síntese de GSNO foi confirmada através de espectrofotometria UV-Vis (Variant® Cary 50, λ 250-600 nm) e o rendimento do processo foi calculado segundo a equação abaixo (Equação 1):

$$R = \frac{M_f - M_i}{GSH + NaNO_2} \times 100 \quad (1)$$

na qual R é o rendimento (%), M_f é a massa final de GSNO (obtida após a liofilização), M_i é a massa inicial de GSNO (antes da liofilização) e GSH e NaNO₂ são as respectivas quantidades adicionadas na preparação.

O monitoramento da decomposição de GSNO ao longo do tempo foi avaliado por espectrofotometria UV-Vis (Variant® Cary 50, λ 200-600 nm). A concentração de GSNO foi calculada de acordo com a Lei de Beer (Equação 2):

$$A = \varepsilon.b.c \quad (2)$$

na qual A é a absorvância, ε é o coeficiente de absorvidade de GSNO ($\varepsilon = 940,0 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), b é o caminho óptico ($b = 1,0 \text{ cm}$) e c é a concentração.

3.2 Preparação das Nanopartículas Poliméricas

3.2.1 Nanopartículas de Alginato-Quitosana (AG/CS) Contendo GSNO

As AG/CS contendo GSNO foram preparadas pelo método de gelificação iônica, adaptado de Douglas *et al.* (2006). Para tanto, 0,01 g de alginato de sódio (Sigma® A2158 ~250 cps) foram dissolvidos em 200 mL de água deionizada (solução 1). O pH desta solução foi ajustado para 4,0, utilizando-se HCl 1,0 M / NaOH 1,0 M. Concomitantemente, 5 mg de GSNO foram dissolvidos em 1 mL de solução de quitosana 1,33% (solução 2). Sob vigorosa agitação magnética (500 RPM), a solução 2 foi gotejada pausadamente na solução 1 e a agitação foi mantida por uma hora, obtendo-se as nanopartículas. Todos os procedimentos descritos foram realizados em temperatura ambiente. As nanopartículas foram armazenadas sob refrigeração (4°C) e proteção da luz, e caracterizadas através dos métodos descritos no item 3.5.

3.2.2 Nanopartículas de Poli(ε-Caprolactona) Recobertas por Quitosana (PCL/CS) e Contendo GSNO

As PCL/CS contendo GSNO foram preparadas pelo método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente, de acordo com protocolo estabelecido por Meng *et al.* (2003). Para tanto, uma fase aquosa foi preparada dissolvendo-se 0,02 g de GSNO em 1 mL de solução de poli(vinil álcool) (PVA) 0,5% (Sigma® P8136). Esta solução foi gotejada em uma fase orgânica contendo 0,06 g de poli(ε-Caprolactona) (PCL) (Sigma® 181609) dissolvidos em 10 mL de acetato de etila,

sob agitação mecânica (Ultra-Turrax® T18) durante 60 segundos a 6000 rpm, formando uma emulsão água em óleo. Em seguida, esta solução foi vertida em outra fase aquosa contendo 1% de PVA, 0,9% de NaCl e 0,22% de quitosana, também sob agitação mecânica (Ultra-Turrax® T18) durante 90 segundos a 10.000 rpm, formando uma dupla emulsão (água em óleo em água). Em seguida, o solvente orgânico foi evaporado à baixa pressão em um rotaevaporador (Buchi® RE 111). Todos os procedimentos descritos foram realizados em temperatura ambiente. As nanopartículas foram armazenadas sob refrigeração (4°C) e proteção da luz, e caracterizadas através dos métodos descritos no item 3.5.

3.3 Eficiência de Encapsulação do GSNO nas Nanopartículas

A eficiência de encapsulação (EE) do GSNO nas nanopartículas poliméricas foi determinada através do método de ultrafiltração-centrifugação. Para tanto, 500 µL da dispersão de nanopartículas, diluída na proporção 1:5 (v/v), foram colocados em filtros Microcon® com corte de massa molar de 10.000 g/mol (Millipore® WCO 10.000), acoplados a micro tubos Eppendorf®; os quais foram centrifugados a 4000 g durante 10 minutos (Eppendorf® 5424). O filtrado foi analisado por espectrofotometria UV-Vis (Hitachi® U-2000, λ 336 nm), a concentração de GSNO foi determinada a partir de uma curva de calibração previamente preparada (Anexo A) e a EE foi calculada através da equação abaixo (Equação 3):

$$EE = \frac{[GSNO]_{inicial} - [GSNO]_{filtrada}}{[GSNO]_{inicial}} \times 100 \quad (3)$$

na qual *EE* é a eficiência de encapsulação (%), *[GSNO]_{inicial}* é a concentração de GSNO utilizada na preparação das nanopartículas e *[GSNO]_{filtrada}* é a concentração de GSNO livre (não encapsulada) contida no sobrenadante filtrado.

3.4 Síntese das Nanopartículas de Prata (AgNPs)

A síntese das AgNPs foi realizada extracelularmente por método biotecnológico, utilizando-se a cepa 551 do fungo *Fusarium oxysporum* procedente do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP Piracicaba). O fungo foi incubado a 28°C por 7 dias, em placas de Petri contendo meio sólido EMA (0,5% de extrato de levedura, 2% de extrato de malte e 2% de ágar) estéril. Após o período de incubação, a biomassa do fungo foi delicadamente retirada, pesada, adicionada em água destilada estéril (10 g biomassa/100 mL água) e mantida em um Erlenmeyer estéril a 28°C e sob agitação de 100 RPM durante 72 horas. Após este período, a biomassa foi peneirada e o sobrenadante (líquido fúngico) foi filtrado à vácuo. Para a redução dos íons de prata ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$) e consequente síntese das nanopartículas, ao líquido fúngico foi adicionado nitrato de prata (AgNO_3) em concentração 10^{-2} M (0,169 g AgNO_3 /100 mL líquido fúngico). A síntese das AgNPs foi confirmada por espectrofotometria UV-Vis (Hitachi® U-2000, λ 200-800 nm) (DURÁN *et al.*, 2005). As nanopartículas foram armazenadas em temperatura ambiente e sob proteção da luz, e caracterizadas através dos métodos descritos no item 3.5.

3.5 Caracterização das Nanopartículas

3.5.1 Caracterização Físico-Química

A caracterização e a estabilidade das nanopartículas foram avaliadas por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZS, Malvern®), através de medidas do diâmetro médio por intensidade de luz espalhada, distribuição de tamanho e potencial Zeta das nanopartículas. Para as análises, as nanopartículas foram diluídas (AG/CS contendo GSNO na proporção 1:1 (v/v) em solução de KCl 1 mM; PCL/CS contendo GSNO na proporção 1:4 (v/v) em água deionizada e, em seguida, na proporção 1:33,3 (v/v) em água deionizada; e AgNPs na proporção 1:20 (v/v) em

solução de KCl 1 mM) e colocadas em uma cubeta de eletroforese. As medidas foram realizadas a uma temperatura constante de 25°C e ângulo de detecção de 173°.

3.5.2 Caracterização Morfológica

3.5.2.1 Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas foram caracterizadas morfolologicamente através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com tensão de aceleração de 20 kV (Jeol® JSM-6360LV). Para tanto, uma gotícula da dispersão coloidal foi colocada sobre uma fita de carbono fixada a um porta-amostra de latão. Após a secagem natural (em temperatura ambiente) da gotícula, o porta-amostra foi metalizado com ouro e paládio em um metalizador (Baltec®) através do processo de *sputtering*, no qual o metal é evaporado e uma fina camada é depositada sobre a amostra.

3.5.2.2 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

As AgNPs foram caracterizadas morfolologicamente através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto, uma gotícula da dispersão diluída foi depositada em um suporte de cobre (Cooper Grids, Ted Pella®) recoberto com um filme de parlódio revestido com carbono. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss® CEM-902, equipado com filtro de energia (Castaing- Henry-Ottensmeyer) (DURÁN *et al.*, 2007).

3.6 **Administração Tópica das Nanopartículas**

Para o tratamento das lesões provocadas pela queimadura induzida aos animais, os sistemas nanoparticulados foram associados a um gel preparado com hidroxietilcelulose (Natrosol®), um polímero não iônico solúvel em água, atóxico, aprovado pelo FDA e amplamente utilizado pela indústria cosmética como espessante e

estabilizante em géis, cremes e loções. O gel puro, utilizado no grupo controle, foi preparado a 2% (2 g Natrosol®/100 g gel), dissolvendo-se 2 g de Natrosol® em 98 mL de água deionizada. O gel contendo GSNO livre foi preparado dissolvendo-se 12 mg de GSNO em 98 mL de água destilada, os quais foram misturados a 2 g de Natrosol®. O gel contendo GSNO encapsulado foi preparado gotejando-se 8,6 mL da dispersão de nanopartículas (equivalente a 12 mg de GSNO) em 100 g de gel puro previamente preparado. Para o preparo do gel contendo AgNPs, 2 g de Natrosol® foram dissolvidos em 98 mL da dispersão. Os géis foram preparados semanalmente em temperatura ambiente, sob vigorosa agitação magnética e proteção da luz, e armazenados sob refrigeração (4°C) e proteção da luz.

3.7 Avaliação do Potencial Citotóxico de GSNO e das Nanopartículas

Para avaliar a influência da composição e de diferentes concentrações dos compostos estudados na viabilidade celular, foram realizados estudos de citotoxicidade comparativos dos efeitos destes compostos em cultura de células (V79, 3T3 e hepatócitos). Estes estudos permitem a comparação quantitativa da resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas ou de vários compostos em um único sistema (EISENBRAND *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2004).

3.7.1 Cultura de Células V79

Células V79 são fibroblastos de uma linhagem de células permanente (clone M-8) proveniente de pulmão de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*) e que apresentam características fundamentais para estudos de citotoxicidade, como velocidade de proliferação e eficiência de clonagem elevadas, estabilidade do cariótipo e manutenção das propriedades originais após criopreservação (RODRIGUEZ & HAUN, 1999). Os fibroblastos foram cultivados continuamente, através de repiques periódicos. O cultivo foi realizado em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e contendo antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL

de sulfato de estreptomicina), em incubadora umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. A contagem de células viáveis foi realizada através do método de exclusão do corante vital Azul de Trypan. Foram plaqueadas 3×10^4 células viáveis/mL (100 µL/cavidade) em placas de 96 cavidades, as quais foram posteriormente incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com meio DMEM suplementado e contendo diferentes concentrações dos compostos estudados, durante 24 horas (CORRÊA *et al.*, 2005).

3.7.2 Cultura de Células 3T3

Células 3T3 são fibroblastos de uma linhagem de células permanente proveniente de camundongos BALB/c. Os fibroblastos foram cultivados continuamente, através de repiques periódicos. O cultivo foi realizado em meio DMEM suplementado (10% de SFB) e contendo antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina), em incubadora umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. A contagem de células viáveis foi realizada através do método de exclusão do corante vital Azul de Trypan. Foram plaqueadas 4×10^4 células viáveis/mL em placas de 96 cavidades, as quais foram posteriormente incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com meio DMEM suplementado e contendo diferentes concentrações dos compostos estudados, durante 24 horas.

3.7.3 Cultura Primária de Hepatócitos

A análise do perfil hepatotóxico de fármacos e xenobióticos em geral é essencial, uma vez que o fígado metaboliza, neutraliza e elimina substâncias tóxicas absorvidas. Portanto, estudos de citotoxicidade utilizando células de fígado (hepatócitos) são muito relevantes. Os hepatócitos foram extraídos do fígado de ratos Wistar machos, pesando entre 250-300 g, através da técnica de perfusão em duas etapas, modificada (GUGUEN-GUILLOUZO & GUILLOUZO, 1986): os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de ketamina 10% (100 mg/kg de peso

– Dopalen, Vetbrands®) e cloridrato de xilasina 2% (10 mg/kg de peso – Anasedan, Vetbrands®) (FLECKNELL, 1996). Uma secção abdominal foi feita de maneira a expor a veia porta hepática, a qual foi obstruída com um fio de algodão e na qual foi feita uma pequena incisão, permitindo a introdução da cânula para perfusão. Imediatamente, o coração dos animais foi dissecado para o sacrifício dos mesmos. O fígado foi então perfundido com solução salina equilibrada de Hank (HBBS) por 20 minutos, a 25 mL/min. Posteriormente, foi novamente perfundido com HBBS contendo colagenase (0,05% colagenase e CaCl_2 1 mM) por 20 minutos, a 15 mL/min. Os hepatócitos, descolados pela ação da colagenase, foram resuspenso em meio DMEM suplementado (10% de SFB, 50 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina, 50 UI/mL de sulfato de estreptomicina, 0,2% de albumina e 0,1 UI/mL de insulina bovinas, dexametasona 10^{-6} M e 1% de dimetilsulfóxido). A contagem de células viáveis foi realizada através do método de exclusão do corante vital Azul de Trypan. Em cada cavidade de placas com 96 cavidades foram plaqueadas 6×10^5 células viáveis/mL, as quais foram posteriormente incubadas a 37°C por 4 horas, em incubadora umidificada com 5% de CO_2 – permitindo a adesão das células às cavidades. Após este período, o meio de cultura foi trocado para remoção de células que não aderiram às cavidades. Posteriormente, as células foram tratadas com meio DMEM suplementado (excetuando-se o SFB) e contendo diferentes concentrações dos compostos estudados, e novamente incubadas a 37°C por 24 horas (CORRÊA *et al.*, 2005).

3.7.4 Ensaio de Toxicidade in vitro

3.7.4.1 Incorporação do Corante Vermelho Neutro (VN)

O ensaio de incorporação do corante Vermelho Neutro foi realizado de acordo com Borenfreund & Puerner (1985). Após o período de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com DMEM sem suplementação, contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de VN, e novamente incubadas a 37°C por 4 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS

para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomos. Em seguida, uma solução aquosa contendo 1% de ácido acético glacial e 50% de etanol foi adicionada para fixar as células e extrair o corante incorporado. As placas foram então colocadas em um leitor de placas de ELISA (BioTek® uQuant) e a viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria UV-Vis (λ 540 nm).

3.7.4.2 Redução do MTT

O ensaio de redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil] tetrazolium (MTT) foi realizado de acordo com Denizot & Lang (1986). Após o período de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS, tratadas com 100 μ L de DMEM contendo MTT (1 mg/mL) e incubadas a 37°C por 4 horas. Em seguida, foi adicionado etanol absoluto para solubilizar o formazan. As placas foram então colocadas em um leitor de placas de ELISA (BioTek® uQuant) e a viabilidade mitocondrial foi avaliada por espectrofotometria UV-Vis (λ 570 nm).

3.7.4.3 Conteúdo de Ácidos Nucleicos

O ensaio para quantificação de ácidos nucleicos foi realizado de acordo com Cingi *et al.* (1991). Após o período de tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS e posteriormente com etanol. As placas foram deixadas para secar naturalmente. Em seguida, 100 μ L de NaOH 0,5 M foram adicionados às placas, as quais foram incubadas a 37°C por uma hora, para lise celular e liberação do ácido nucleico. As placas foram então colocadas em um leitor de placas de ELISA (BioTek® uQuant) e o conteúdo de ácidos nucleicos foi avaliado por espectrofotometria UV-Vis (λ 260 nm).

3.8 Avaliação do Potencial Tóxico de GSNO e das Nanopartículas em Animais Induzidos à Queimadura Térmica

Os protocolos envolvendo o uso de animais em experimentação foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA – UNICAMP), em 04 de abril de 2011, sob protocolo nº 2361-1 (Anexo B).

3.8.1 Animais

Os animais envolvidos no projeto foram recebidos sete dias antes do início dos experimentos, para aclimatação, e mantidos em gaiolas coletivas até o início dos mesmos. Foram utilizados 80 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando cerca de 250-300 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério do Hospital SOBRAPAR – Crânio e Face, em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo 12h claro/escuro, com ração comercial padrão (Nuvilab® CR1) e água *ad libitum*.

3.8.2 Padronização dos Grupos

Os animais foram classificados em quatro grupos, de acordo com o tratamento recebido após a indução da queimadura térmica:

C: Grupo controle, tratado com gel puro (n = 20)

G: Grupo tratado com gel contendo GSNO livre (n = 20)

NG: Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS (n = 20)

AG: Grupo tratado com gel contendo AgNPs (n = 20)

Cada grupo foi ainda subdividido em quatro subgrupos (n = 5), de acordo com os diferentes períodos de tratamento/eutanásia (7, 14, 21 e 35 dias).

3.8.3 Indução da Queimadura Térmica

Para a indução da queimadura, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de ketamina 10% (100 mg/kg de peso – Dopalen, Vetbrands®) e cloridrato de xilasina 2% (10 mg/kg de peso – Anasedan, Vetbrands®) (FLECKNELL, 1996). Posteriormente, os animais foram tricotomizados e colocados em decúbito dorsal sobre um molde de borracha isolante, com abertura central circular de 3 cm de diâmetro – baseado em modelo publicado por Walker *et al.* (1968) (Figura 16). Em seguida, molde e animal foram expostos a um banho-maria (Tecnal® TE-0541) contendo água a uma temperatura constante de 90°C, por 6 segundos. Imediatamente à exposição, a reidratação foi realizada aplicando-se solução salina a 0,9% (1 mL/kg de peso), por via subcutânea, na área lesionada. Após a indução da queimadura, os animais foram colocados em gaiolas individualizadas. Para o alívio da dor provocada pela queimadura, dipirona sódica (50 mg/kg de peso) foi administrada na água fornecida aos animais durante os três primeiros dias pós-queimadura.

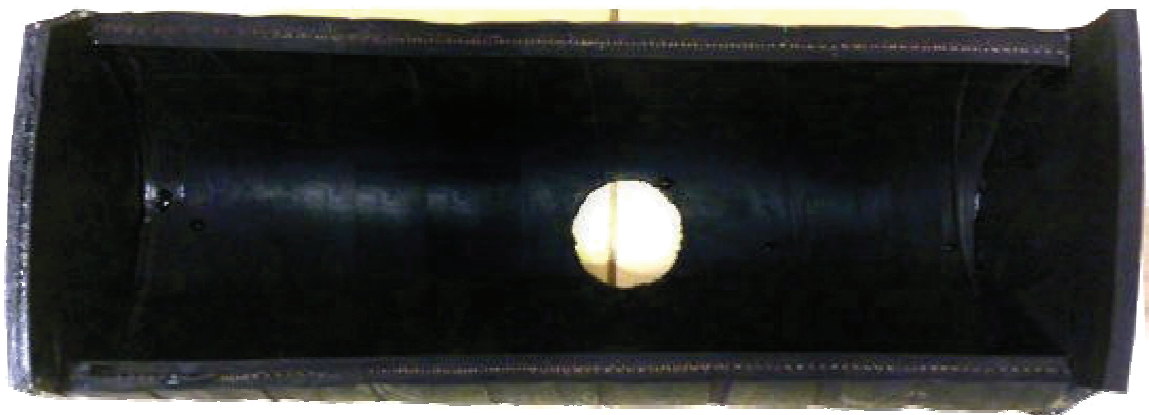


Figura 16 - Molde de borracha isolante, com abertura central circular de 3 cm de diâmetro, utilizado para indução da queimadura térmica nos animais. Baseado no modelo publicado por Walker *et al.* (1968).

3.8.4 Tratamento das Queimaduras e Coleta das Amostras

O tratamento das lesões foi realizado todos os dias, duas vezes ao dia, aplicando-se cerca de 0,1 g de gel na área lesionada, a qual não foi coberta. Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de ketamina 10% (100 mg/kg de peso – Dopalen, Vetbrands®) e cloridrato de xilasina 2% (10 mg/kg de peso – Anasedan, Vetbrands®) (FLECKNELL, 1996), e uma secção torácica foi feita de maneira a expor a aorta para a coleta (em seringa heparinizada) de cerca de 4 mL de sangue – os quais foram utilizados para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos e análise da concentração de prata, descritos nos itens 3.8.5, 3.8.6 e 3.8.7, respectivamente. Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletados pele (intacta e lesionada) do dorso, fígado, rins, pulmão e baço para análise da concentração de prata e avaliação do processo de cicatrização, descritos nos itens 3.8.7 e 3.9, respectivamente.

3.8.5 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

Imediatamente à coleta, parte do sangue coletado na seringa (cerca de 3,5 mL) foi cuidadosamente colocada em tubos com gel separador contendo heparina (Vacuette®). O sangue foi centrifugado (Centribio® TDL80-2B) a 2500 rpm por 10 minutos, resultando na separação entre plasma e elementos figurados. O plasma obtido foi cuidadosamente retirado e congelado em freezer (-20°C) para posterior análise quanto aos parâmetros: creatinina, ureia, proteínas totais, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina e glicose. Todas as análises foram realizadas utilizando-se kits Labtest® específicos para cada parâmetro e seguindo-se as instruções determinadas pelo fabricante, em um analisador semiautomático Bioplus® BIO-2000.

3.8.6 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

Imediatamente à coleta, uma pequena parte do sangue coletado na seringa (0,5 mL) foi cuidadosamente colocada em micro tubos contendo EDTA (Sunphoria Co. Ltda. MC0582). O sangue foi aspirado e analisado através de um contador automático de células sanguíneas (Sysmex® KX-21-N), obtendo-se a análise de 18 parâmetros com os histogramas das séries vermelha, branca e plaquetária.

3.8.7 Biodistribuição de Prata em Sangue e Órgãos

A análise da concentração de prata presente no sangue e em diferentes órgãos (pele, fígado, rins, pulmão e baço) foi realizada por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Para tanto, 400 mg de amostra foram digeridos com HNO₃ concentrado, seguido de H₂O₂ (30%).

3.9 Avaliação do Potencial de Cicatrização de GSNO e das Nanopartículas nos Animais Induzidos à Queimadura

3.9.1 Redução das Lesões

A redução das lesões foi acompanhada macroscopicamente através de medidas do diâmetro da área lesionada, em centímetros, com um paquímetro Mitutoyo®, 24 horas após a indução da queimadura e posteriormente 7, 14, 21 e 35 dias após a indução.

3.9.2 Avaliação do Processo de Cicatrização

Após a eutanásia dos animais, os fragmentos de pele coletados foram lavados com tampão fosfato-salino e, em seguida, mantidos em frascos contendo solução de paraformaldeído 4%, durante 24 horas, para adequada fixação.

Posteriormente, os fragmentos foram processados com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) para desidratação do tecido. Após a etapa de desidratação, os fragmentos foram mergulhados em solução de xilol, para completa remoção do álcool e posterior impregnação em parafina. A partir dos blocos de parafina, secções longitudinais de 5,0 μm de espessura foram obtidas com um micrótomo manual e fixadas em lâminas de microscopia, as quais foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes foram avaliados quanto à morfologia, vascularização e presença de marcadores que evidenciassem o processo de cicatrização (como aumento da celularidade local e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos), através de microscopia de luz convencional utilizando o microscópio FW 4500 B, da Leica®.

3.10 Análises Estatísticas

Os gráficos de preparação e caracterização de GSNO e das nanopartículas e os gráficos dos testes *in vitro* foram realizados utilizando-se o software OriginPro® 8 (v. 8.0724 B724). Os gráficos e as análises estatísticas dos testes *in vivo* foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism® 5 (v. 5.04). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se Two-way ANOVA e Bonferroni (pós-teste). Foram considerados significativos os valores de p para os quais $p < 0.05$.

*Resultados e
Discussão*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e Decomposição de S-Nitrosoglutationa (GSNO)

A síntese de GSNO foi confirmada pelo pico de máxima intensidade de absorção em 336 nm (Figura 17), característica do grupo S-NO ($\mathcal{E} = 940 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (MARCATO *et al.*, 2011; SEABRA *et al.*, 2004b; SHISHIDO *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2002; HART, 1985). O rendimento em massa do processo de síntese foi de $47,30\% \pm 5,88$. Este valor baixo de rendimento pode estar associado às perdas de massa durante os processos de lavagem e filtração do GSNO. Entretanto, a conversão de GSH em GSNO foi de $82,27\% \pm 15,76$.

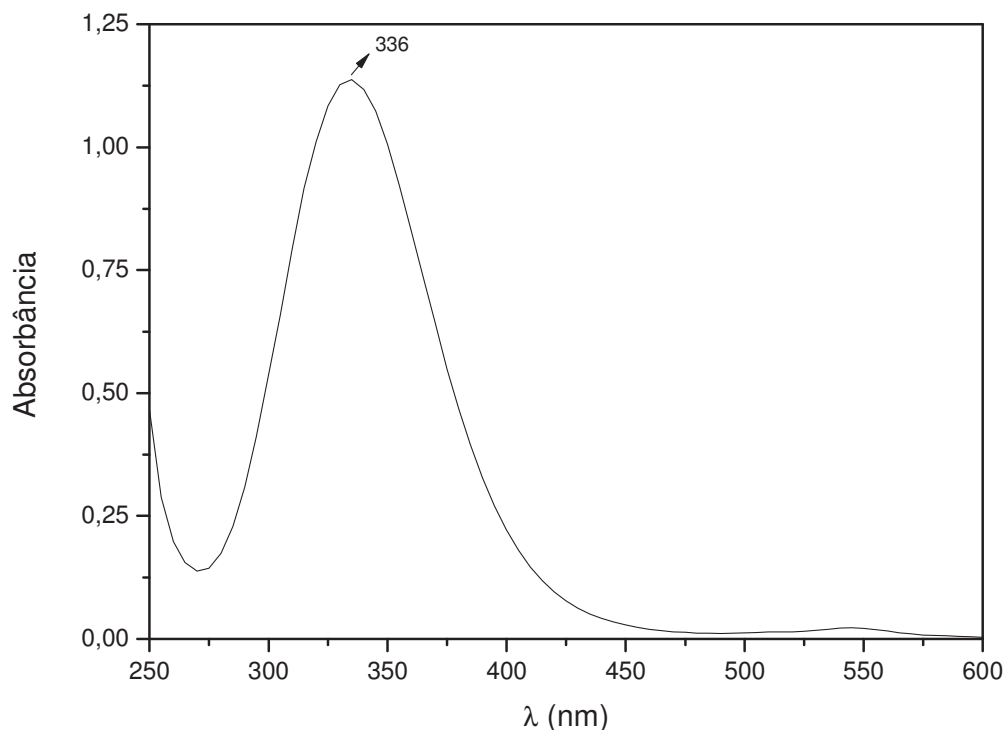


Figura 17 - Espectro UV-Vis da síntese de GSNO. A seta indica o pico de máxima intensidade de absorção do composto (336 nm), característica do grupo S-NO.

A decomposição de GSNO foi avaliada a partir de duas amostras (**A** e **B**) sintetizadas em dias diferentes; as quais foram armazenadas em freezer (-20°C) sob proteção da luz e acompanhadas durante 3 e 8 meses após a síntese, respectivamente. A decomposição foi evidenciada pela diminuição do pico de máxima intensidade de absorção em 336 nm, atribuída à clivagem homolítica da ligação S-N, com consequente liberação de NO e formação de GSH oxidada – evidenciada pelo aparecimento de um pico de máxima intensidade de absorção em torno de 250 nm (Figura 18) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2002). Após 3 meses, a concentração de GSNO da amostra **A** passou de 0,59 mg/mL para 0,53 mg/mL (redução de 10,17%); enquanto que a concentração da amostra **B**, após 8 meses, passou de 1,15 mg/mL para 0,80 mg/mL (redução de 30,43%). Para cada teste *in vitro* ou *in vivo*, uma nova amostra de GSNO foi sintetizada e utilizada em até 7 dias, garantindo pouca ou nenhuma decomposição do composto.

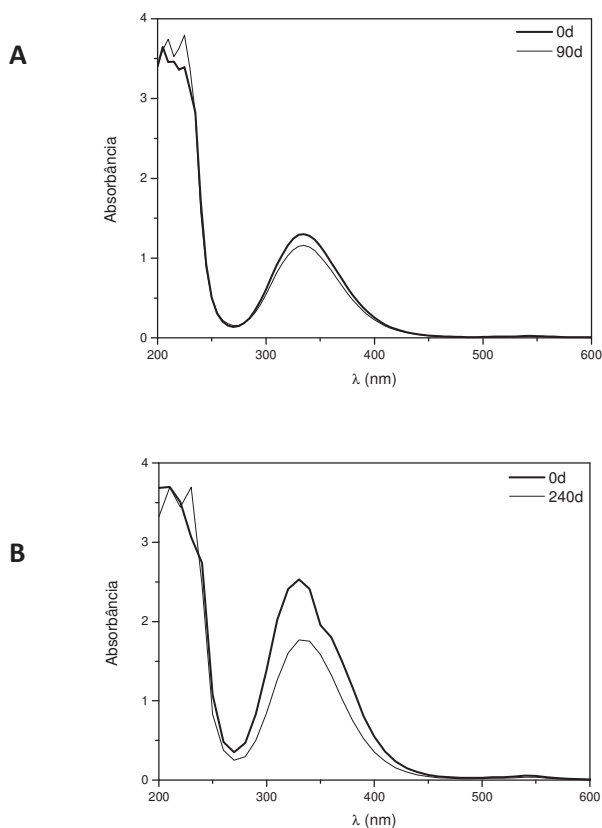


Figura 18 - Espectros UV-Vis da decomposição de duas amostras de GSNO (**A** e **B**), sintetizadas em dias diferentes, 3 e 8 meses após a síntese, respectivamente.

4.2 Caracterização das Nanopartículas

4.2.1 *Nanopartículas de Alginato-Quitosana (AG/CS)*

Os valores de diâmetro médio (Z-average), distribuição de tamanho (Pdl) e potencial Zeta obtidos após a preparação das AG/CS e das AG/CS contendo GSNO estão apresentados na Figura 19 e na Tabela 1. A estabilidade físico-química das nanopartículas foi avaliada ao longo de 28 dias, com intervalos de 7 dias.

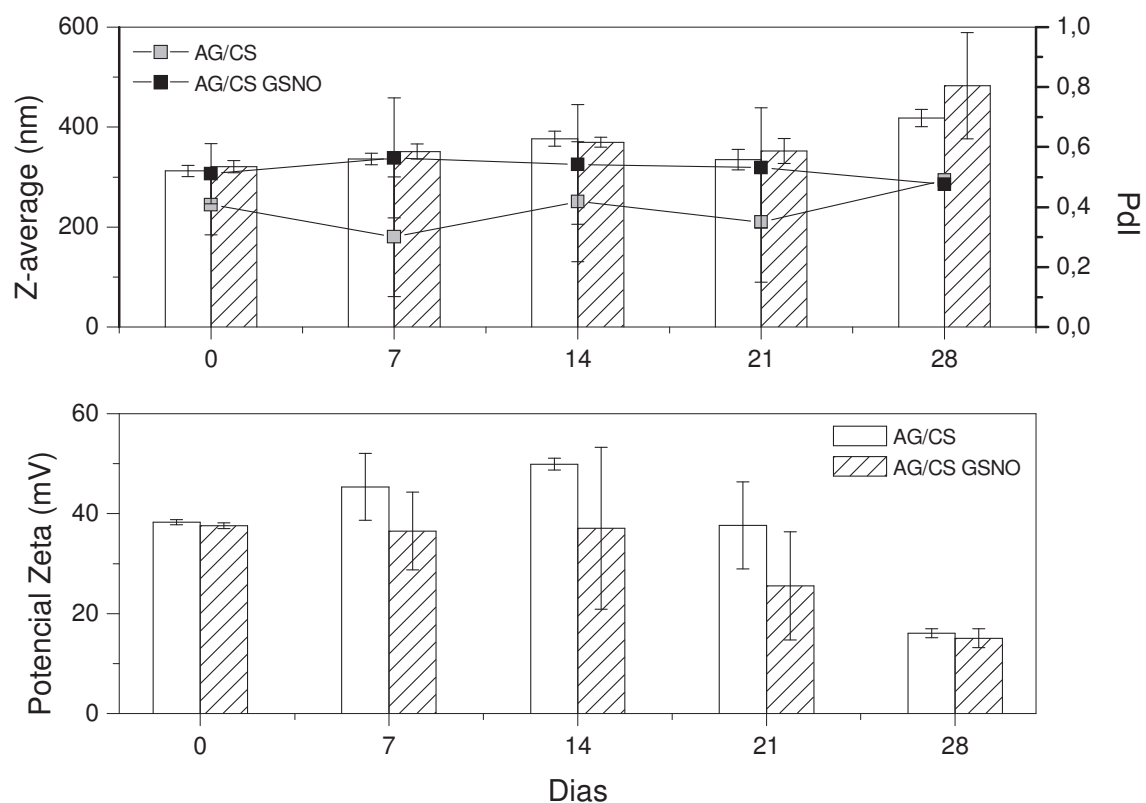


Figura 19 - Estabilidade físico-química de AG/CS e AG/CS contendo GSNO, armazenadas sob refrigeração (4°C) e proteção da luz, imediatamente após o preparo (dia 0) e ao longo de 28 dias. Barras indicam diâmetro médio (acima) e potencial Zeta (abaixo). Linhas indicam distribuição de tamanho (Pdl).

Tabela 1 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de AG/CS e AG/CS contendo GSNO

Tempo (dias)	AG/CS			AG/CS contendo GSNO		
	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	312,3 ± 10,9	0,408 ± 0,1	+38,30 ± 0,5	321,0 ± 12,2	0,511 ± 0,1	+37,60 ± 0,6
7	336,1 ± 11,7	0,301 ± 0,2	+45,40 ± 6,7	351,1 ± 15,1	0,564 ± 0,2	+36,53 ± 7,8
14	376,7 ± 15,2	0,418 ± 0,2	+49,90 ± 1,2	369,7 ± 10,0	0,542 ± 0,2	+37,07 ± 16,2
21	334,8 ± 20,5	0,350 ± 0,1	+37,70 ± 8,7	352,5 ± 25,0	0,531 ± 0,2	+25,57 ± 10,8
28	418,2 ± 17,3	0,490 ± 0,0	+16,10 ± 0,9	482,7 ± 106,3	0,476 ± 0,0	+15,07 ± 1,9

DM = diâmetro médio (avaliado por intensidade de luz espalhada); Pdl = distribuição de tamanho
 * Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3)

As AG/CS obtidas apresentaram diâmetro médio de $312,3 \pm 10,9$ nm e carga superficial positiva ($+38,30 \pm 0,5$ mV). Uma vez que o alginato possui carga negativa, estes resultados sugerem um excesso de quitosana, a qual possui carga positiva, na superfície das nanopartículas. As AG/CS contendo GSNO apresentaram diâmetro médio de $321,0 \pm 12,2$ nm e potencial Zeta de $+37,60 \pm 0,6$ mV. Estes resultados indicam que a encapsulação de GSNO não alterou significativamente as características físico-químicas das nanopartículas. Os valores de potencial Zeta das nanopartículas, em torno de $+30,0$ mV, teoricamente indicam alta estabilidade físico-química das dispersões, por proporcionarem maior repulsão eletrostática entre as nanopartículas, evitando a agregação das mesmas (LEBRE *et al.*, 2012). Após 28 dias, os valores de potencial Zeta reduziram cerca de 2,5 vezes; enquanto que os diâmetros médios aumentaram cerca de 1,5 vez – sugerindo uma possível agregação das nanopartículas, provavelmente devido à menor repulsão eletrostática entre elas. A eficiência de encapsulação do GSNO das nanopartículas foi bastante baixa ($18,6 \pm 6,8\%$), alcançando valores próximos de zero nas primeiras 24 horas após a encapsulação – podendo ser devido à alta afinidade de GSNO pela fase aquosa da dispersão. Não foi possível a observação das nanopartículas por MEV, devido à coalescência das mesmas durante o processo de secagem necessário para a realização da microscopia.

A estabilidade das nanopartículas também pode ser atribuída à presença de quitosana, que proporciona estabilidade estérica a elas. Em contrapartida, a quitosana pode aumentar consideravelmente o diâmetro das nanopartículas, dependendo da concentração utilizada na preparação das mesmas. Em estudos pré-otimização de AG/CS contendo amoxicilina, Arora *et al.* (2011) observaram relação direta entre o diâmetro médio das nanopartículas e a concentração de quitosana – triplicando-se a concentração de quitosana, o diâmetro médio obtido foi cerca de 2,5 vezes maior. Resultados semelhantes foram obtidos por Motwani *et al.* (2008), os quais observaram que triplicando-se as concentrações de alginato e quitosana, o diâmetro médio das nanopartículas foi cerca de 3 vezes maior (205,0 nm para concentrações de 0,2% de alginato e 0,1% de quitosana *versus* 572,0 nm para concentrações de 0,6% de alginato e 0,3% de quitosana).

4.2.2 Nanopartículas de PCL Recobertas por Quitosana (PCL/CS)

Inicialmente, foram preparadas nanopartículas de PCL recobertas com quitosana (PCL/CS) com quatro diferentes volumes finais (10 mL, 15 mL, 30 mL e 40 mL), para avaliação da amostra mais concentrada sem interferências relevantes nos parâmetros físico-químicos. Os valores de diâmetro médio (Z-average), distribuição de tamanho e potencial Zeta obtidos após a preparação das nanopartículas estão apresentados na Figura 20 e na Tabela 2. A estabilidade físico-química das nanopartículas foi avaliada ao longo de 28 dias, com intervalos de 7 dias.

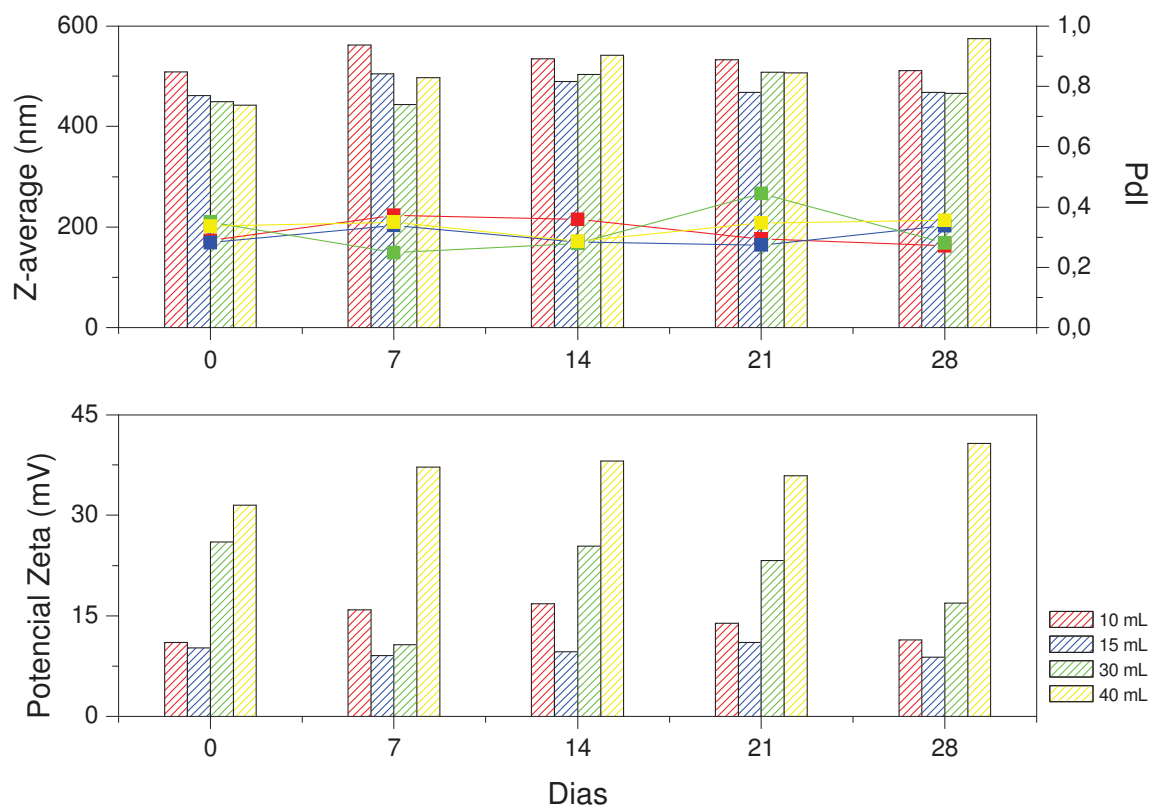


Figura 20 - Estabilidade físico-química de PCL/CS com diferentes volumes finais (10 mL, 15 mL, 30 mL e 40 mL), armazenadas sob refrigeração (4°C) e proteção da luz, imediatamente após o preparo (dia 0) e ao longo de 28 dias. Barras indicam diâmetro médio (acima) e potencial Zeta (abaixo). Linhas indicam distribuição de tamanho (PDI). As cores indicam os diferentes volumes finais: 10 mL (vermelho), 15 mL (azul), 30 mL (verde) e 40 mL (amarelo).

Tabela 2 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de PCL/CS com diferentes volumes finais

Tempo (dias)	PCL/CS 10 mL			PCL/CS 15 mL		
	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	508,5	0,289	+11,00	461,8	0,282	+10,20
7	562,4	0,372	+15,90	505,2	0,339	+9,12
14	535,3	0,359	+16,80	489,1	0,283	+9,63
21	532,6	0,294	+13,90	468,2	0,274	+11,00
28	511,5	0,271	+11,40	467,7	0,338	+8,85

Tempo (dias)	PCL/CS 30 mL			PCL/CS 40 mL		
	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	449,8	0,350	+26,00	442,4	0,337	+31,50
7	444,1	0,248	+10,70	497,2	0,350	+37,20
14	503,5	0,279	+25,40	541,4	0,286	+38,10
21	507,8	0,445	+23,30	506,5	0,347	+35,90
28	465,8	0,281	+16,90	574,8	0,355	+40,70

DM = diâmetro médio (avaliado por intensidade de luz espalhada); Pdl = distribuição de tamanho

Não houve diferenças significativas entre as quatro formulações quanto aos parâmetros físico-químicos avaliados. As nanopartículas apresentaram carga superficial positiva, confirmando o recobrimento de sua superfície com quitosana. Embora os valores de potencial Zeta das PCL/CS com volume final de 10 mL tenham sido baixos, esta preparação foi escolhida para os estudos posteriores por ser a mais concentrada, permitindo a utilização de um menor volume de dispersão para obtenção da concentração de GSNO desejada no gel posteriormente aplicado nos animais. Através da imagem obtida por MEV, foi possível observar PCL/CS esféricas e relativamente homogêneas (Figura 21).

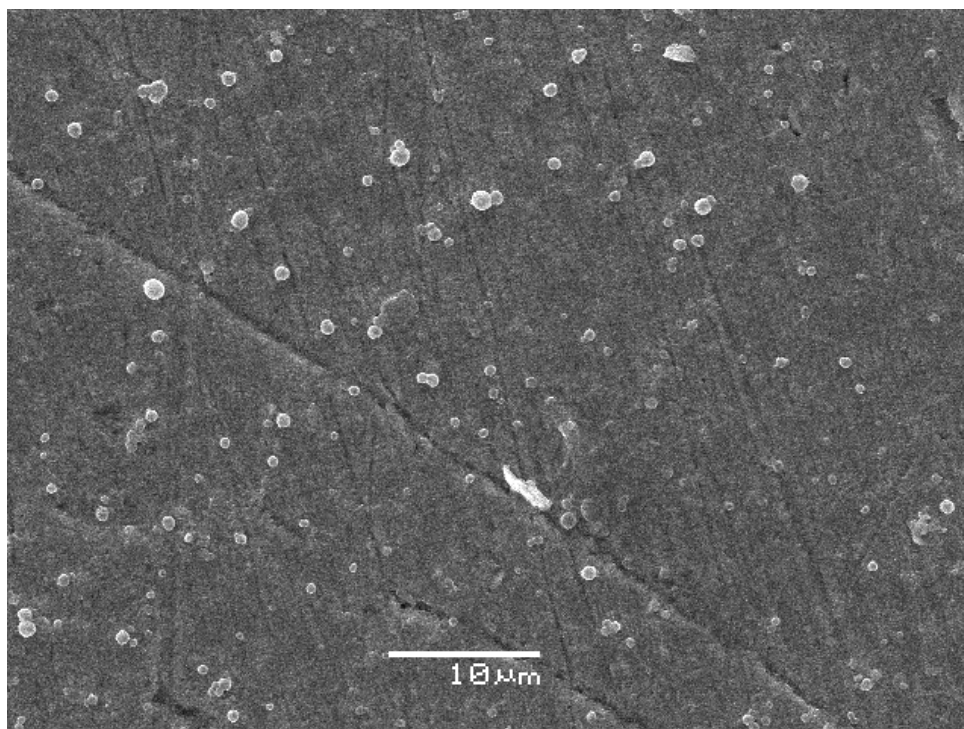


Figura 21 - Imagem obtida por MEV de PCL/CS com volume final de 10 mL (x 2,000).

4.2.3 Nanopartículas de PCL Recobertas por Quitosana (PCL/CS) e Contendo GSNO

PCL/CS contendo GSNO foram preparadas com quatro diferentes concentrações do composto (10 mg, 15 mg, 20 mg e 25 mg), para avaliação da maior concentração possível sem interferência nas características físico-químicas das nanopartículas. Os valores de diâmetro médio (Z-average), distribuição de tamanho e potencial Zeta obtidos após a preparação das nanopartículas estão apresentados na Figura 22 e na Tabela 3. A estabilidade físico-química das nanopartículas foi avaliada ao longo de 28 dias, com intervalos de 7 dias.

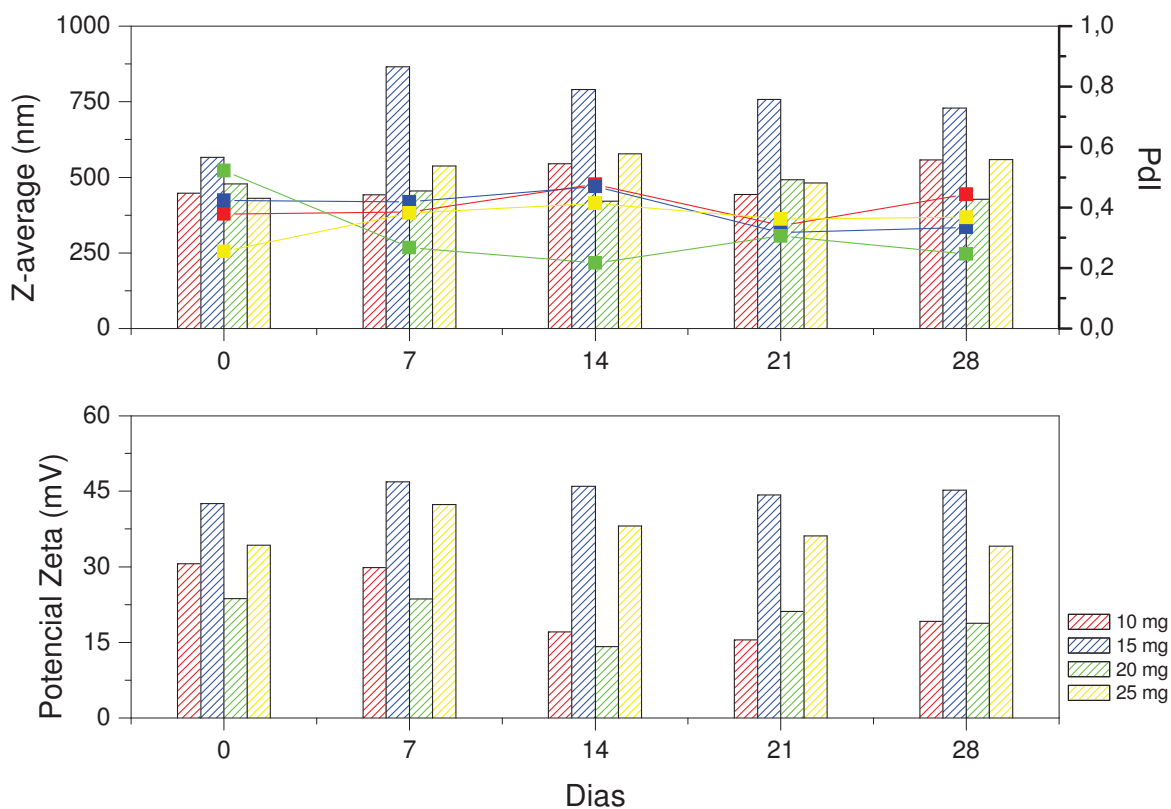


Figura 22 - Estabilidade físico-química de PCL/CS contendo diferentes concentrações de GSNO (10 mg, 15 mg, 20 mg e 25 mg), armazenadas sob refrigeração (4°C) e proteção da luz, imediatamente após o preparo (dia 0) e ao longo de 28 dias. Barras indicam diâmetro médio (acima) e potencial Zeta (abaixo). Linhas indicam distribuição de tamanho (PDI). As cores indicam as diferentes concentrações de GSNO utilizadas na preparação das nanopartículas: 10 mg (vermelho), 15 mg (azul), 20 mg (verde) e 25 mg (amarelo).

Tabela 3 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho, potencial Zeta e eficiência de encapsulação (EE) de PCL/CS contendo GSNO em diferentes concentrações

PCL/CS 10 mg					PCL/CS 15 mg			
Tempo (dias)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	EE	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	EE
0	447,1	0,378	+30,6	7,46 mg	566,4	0,423	+42,6	10,96 mg
7	442,9	0,385	+29,9	-	865,1	0,419	+46,9	-
14	545,0	0,477	+17,1	-	791,0	0,470	+46,0	-
21	443,8	0,340	+15,5	-	757,2	0,317	+44,3	-
28	557,3	0,444	+19,2	-	728,9	0,334	+45,2	-

PCL/CS 20 mg					PCL/CS 25 mg			
Tempo (dias)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	EE	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	EE
0	478,2	0,522	+23,7	15,60 mg	430,8	0,254	+34,3	9,90 mg
7	453,9	0,267	+23,6	-	537,5	0,382	+42,4	-
14	421,1	0,217	+14,2	-	578,3	0,414	+38,1	-
21	492,5	0,305	+21,2	-	481,0	0,361	+36,2	-
28	426,8	0,246	+18,8	-	558,8	0,368	+34,1	-

DM = diâmetro médio (avaliado por intensidade de luz espalhada); Pdl = distribuição de tamanho; EE = eficiência de encapsulação

Não houve diferenças significativas entre as formulações quanto ao diâmetro médio; com exceção das PCL/CS contendo 15 mg de GSNO, as quais apresentaram-se cerca de 1,3 vez maiores que as demais. As nanopartículas apresentaram carga superficial positiva, confirmando o recobrimento de sua superfície com quitosana. A concentração de GSNO encapsulado aumentou conforme aumentou a concentração adicionada na preparação das nanopartículas; com exceção das nanopartículas preparadas com 25 mg de GSNO, as quais apresentaram eficiência de encapsulação (EE) menor que as preparadas com 20 mg. Esta diminuição pode estar relacionada à capacidade de carregamento das nanopartículas ou à baixa afinidade do GSNO (hidrofílico) pelos polímeros (hidrofóbicos) – portanto, a EE pode não apresentar uma relação linear com o aumento da massa dos polímeros utilizada nas preparações. Além disso, o aumento da massa dos polímeros possivelmente altera a viscosidade e a

lipofilicidade do meio, o que também pode interferir na EE. Sendo assim, as PCL/CS contendo 20 mg de GSNO foram escolhidas para os estudos posteriores por apresentarem a maior massa de GSNO encapsulada. Para validar sua reprodutibilidade, três amostras foram preparadas no mesmo dia. Os valores de diâmetro médio (Z-average), distribuição de tamanho e potencial Zeta obtidos após a preparação das nanopartículas estão apresentados na Figura 23 e na Tabela 4. A estabilidade físico-química das nanopartículas foi avaliada ao longo de 28 dias, com intervalos de 7 dias.

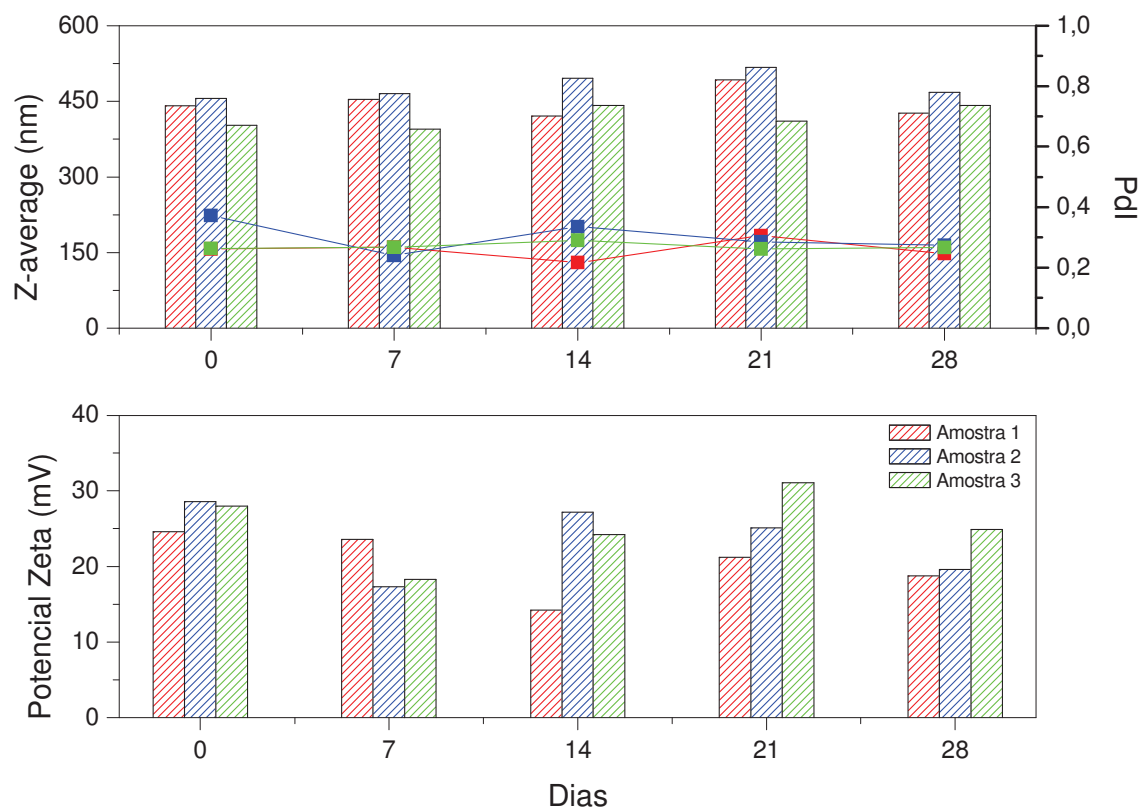


Figura 23 - Estabilidade físico-química de três amostras, preparadas no mesmo dia, de PCL/CS contendo 20 mg de GSNO, armazenadas sob refrigeração (4°C) e proteção da luz, imediatamente após o preparo (dia 0) e ao longo de 28 dias. Barras indicam diâmetro médio (acima) e potencial Zeta (abaixo). Linhas indicam distribuição de tamanho (PDI). As cores indicam as diferentes amostras: amostra 1 (vermelho), amostra 2 (azul) e amostra 3 (verde).

Tabela 4 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de PCL/CS contendo 20 mg de GSNO

Tempo (dias)	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3		
	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	440,8	0,261	+24,6	456,1	0,372	+28,6	402,4	0,263	+28,0
7	453,9	0,267	+23,6	465,4	0,240	+17,3	394,2	0,267	+18,3
14	421,1	0,217	+14,2	496,1	0,335	+27,2	441,7	0,290	+24,2
21	492,5	0,305	+21,2	517,2	0,285	+25,1	411,1	0,262	+31,1
28	426,8	0,246	+18,8	468,2	0,274	+19,6	441,7	0,266	+24,9

DM = diâmetro médio (avaliado por intensidade de luz espalhada); Pdl = distribuição de tamanho

Não houve diferenças significativas entre as amostras em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados. Logo após a preparação, as nanopartículas apresentaram diâmetro médio de $433,1 \pm 27,6$ nm, distribuição de tamanho de $0,298 \pm 0,06$ e potencial Zeta de $+27,0 \pm 2,15$ mV. A eficiência de encapsulação foi de $12,7 \pm 2,7$ mg de GSNO ($61,6 \pm 11,5\%$) – relativamente alta, considerando-se que o GSNO é altamente hidrofílico e tende a permanecer na fase aquosa da dispersão.

Para complementar as análises por espectroscopia de correlação de fótons (ECF), *Nanoparticle Tracking Analysis*¹ (NTA) foi realizada para caracterizar as nanopartículas quanto ao diâmetro médio, utilizando-se o microscópio digital LM10 System, da NanoSight®. Esta técnica permite a análise em tempo real do movimento Browniano das partículas (através de uma câmera com dispositivo de carga acoplado) e é mais adequada para amostras polidispersas, por realizar medidas partícula por partícula; enquanto a ECF realiza medidas da média de partículas com maior espalhamento de luz – podendo resultar em uma média ponderada de intensidade não confiável em amostras polidispersas (FILIPE *et al.*, 2010). As amostras foram diluídas em água deionizada e as medidas foram realizadas a $25,2^{\circ}\text{C}$ e analisadas pelo software *Nanoparticle Tracking Analysis*® (v. 2.0). O diâmetro médio obtido foi de $341,0 \pm 118,0$ nm ($3,51 \times 10^8$ partículas/mL). Este resultado é coerente, uma vez que as medidas de

¹ Análise de rastreamento de nanopartículas

distribuição de tamanho obtidas por NTA são realizadas partícula por partícula – sendo assim um método mais preciso. Resultados similares foram obtidos por Mazzarino *et al.* (2012), que verificaram que os diâmetros médios de PCL/CS contendo curcumina, obtidos por NTA foram menores em relação aos obtidos por ECF. A Figura 24 mostra uma imagem obtida do vídeo em tempo real do movimento Browniano das nanopartículas, na qual é possível observar nanopartículas menores e algumas maiores (possivelmente nanopartículas agregadas).

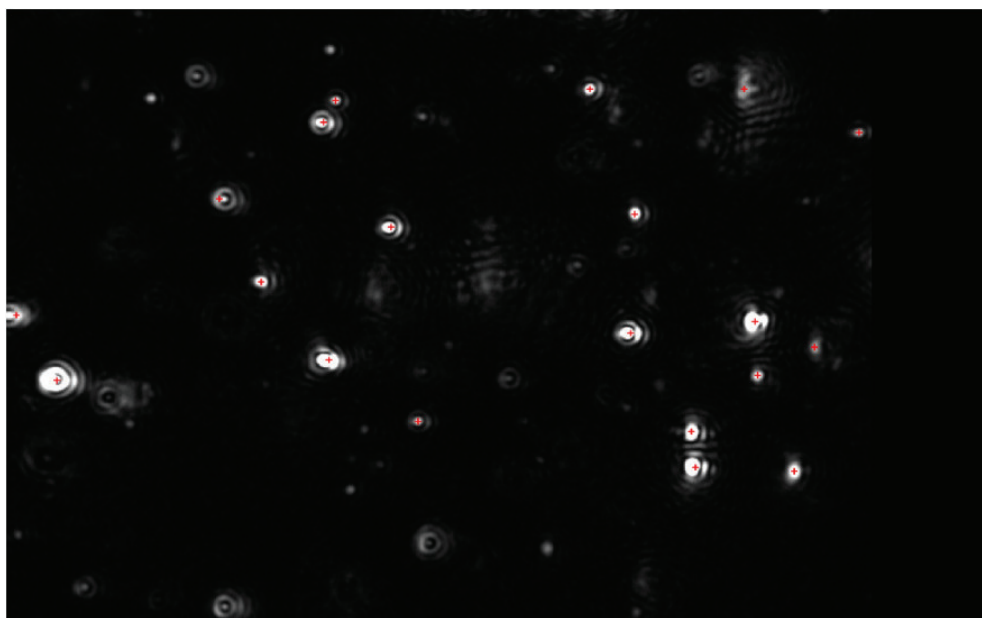


Figura 24 - Imagem obtida do vídeo, em tempo real, do movimento Browniano de PCL/CS contendo GSNO.

As imagens obtidas por MEV das PCL/CS contendo GSNO mostraram nanopartículas esféricas e homogêneas (Figura 25). Em maior aumento, foi possível observar a agregação de algumas nanopartículas, provavelmente ocasionada durante o processo de secagem necessário para a realização da microscopia.

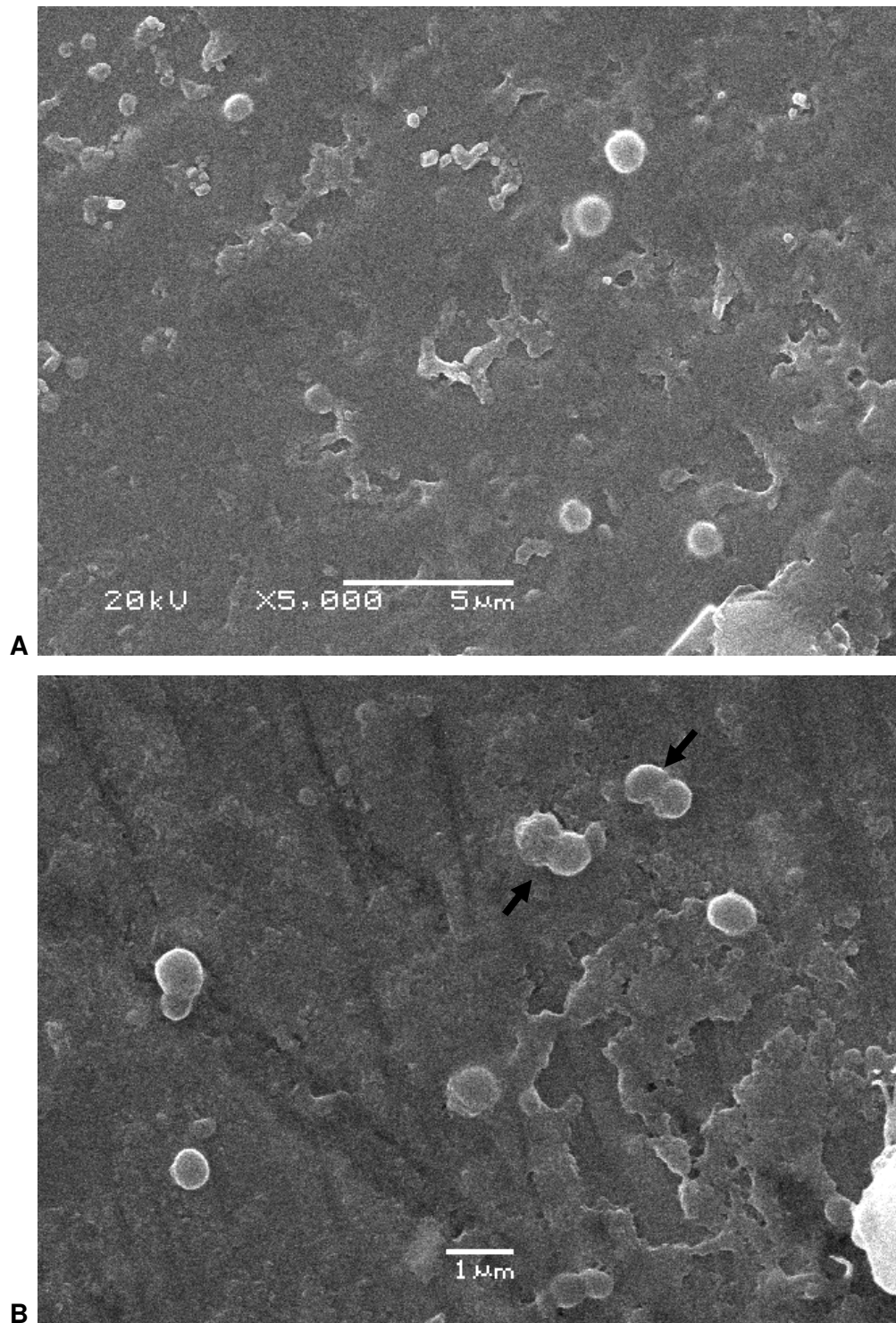


Figura 25 - Imagens obtidas por MEV de PCL/CS contendo GSNO em menor e maior aumento (A e B, respectivamente). Em maior aumento (x 10,000), foi possível observar a possível agregação de algumas nanopartículas (setas).

4.2.4 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

A síntese de AgNPs foi evidenciada através da mudança de coloração do líquido fúngico, de amarelada para acastanhada, 24 horas após a adição de AgNO_3 10^{-2} M (Figura 26) – indicando que a redução dos íons de prata ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$) ocorreu extracelularmente, através de agentes redutores liberados pelo *Fusarium oxysporum* na solução aquosa (AHMAD *et al.*, 2003; DURÁN *et al.*, 2005). A solução foi armazenada em temperatura ambiente e sob proteção da luz, e permaneceu estável por vários meses após a reação (não apresentando evidências de floculação das nanopartículas).

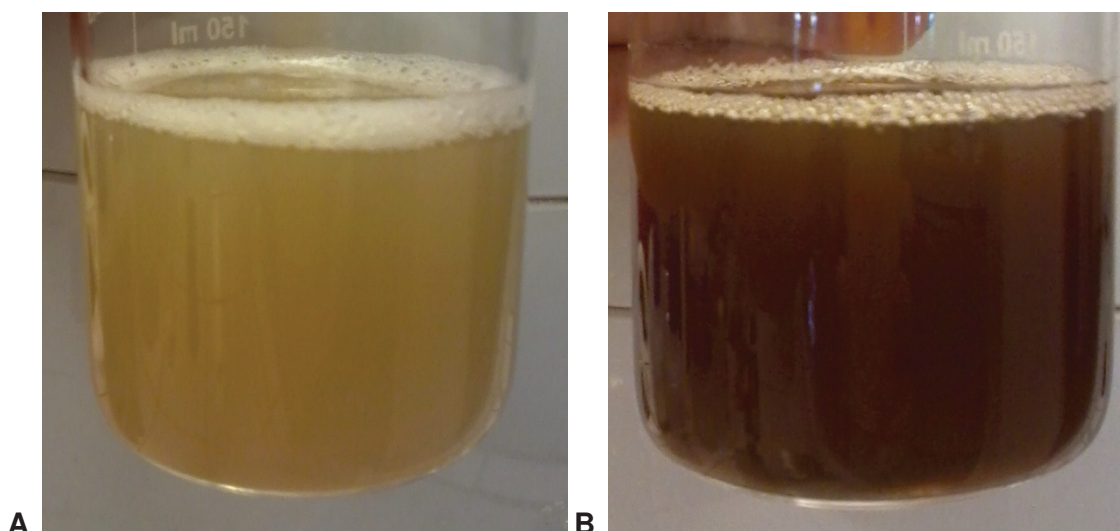


Figura 26 - Béqueres contendo solução aquosa de AgNO_3 10^{-2} M, no início da reação (A) e após 24 horas (B).

A produção das nanopartículas também foi evidenciada por espectrofotometria UV-Vis (Hitachi® U-2000), através da formação de uma banda de absorção de plasmon centrada entre 410 e 425 nm, que expressivamente aumentou em intensidade com o passar do tempo (Figura 27). Através dos espectros de UV-Vis na região de baixo comprimento de onda (inserção da Figura 27), foi possível observar uma banda de absorção centrada em 265 nm, que pode ser atribuída a aminoácidos aromáticos de proteínas. Esta banda forma-se devido às excitações eletrônicas nos

resíduos de triptofano e tirosina nestas proteínas e indica a liberação das mesmas na solução pelo *Fusarium oxysporum* – sugerindo o possível mecanismo pelo qual os íons metálicos presentes na solução são reduzidos e as nanopartículas formadas (AHMAD *et al.*, 2003; DURÁN *et al.*, 2005).

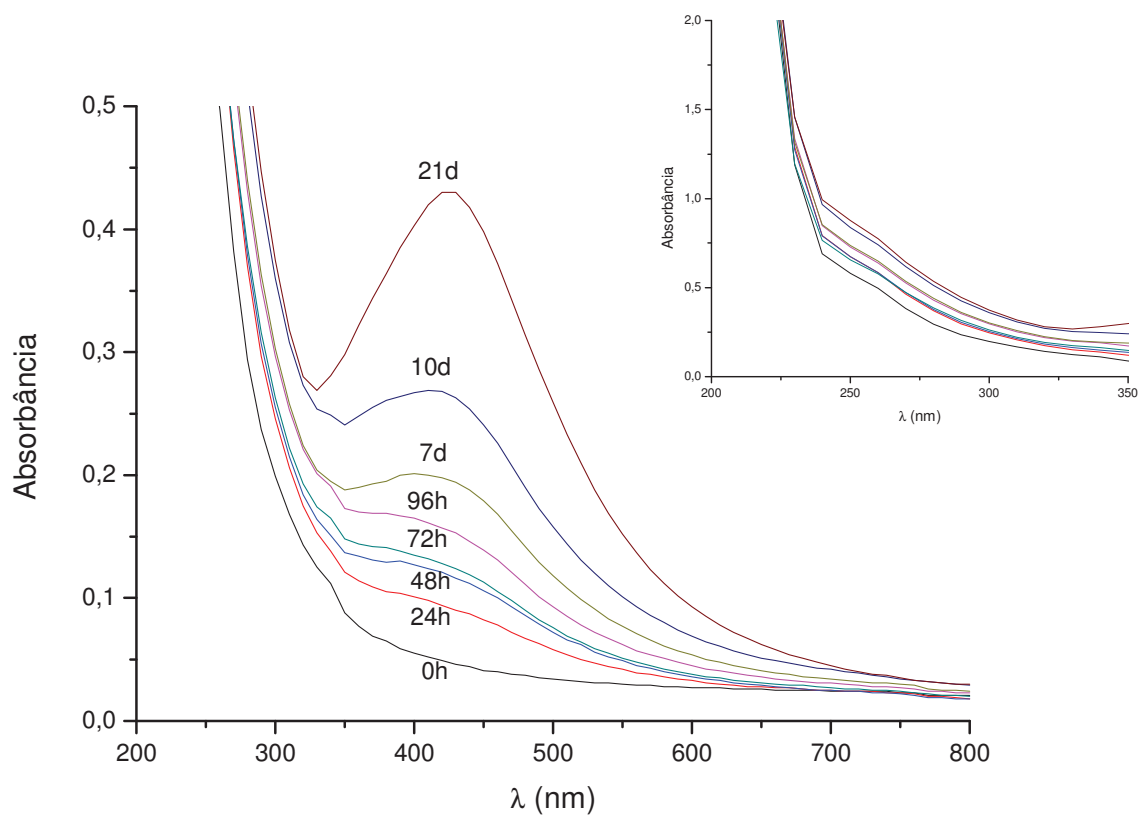


Figura 27 - Espectros UV-Vis da reação de uma solução aquosa de AgNO₃ 10⁻² M em função do tempo. A inserção mostra os mesmos espectros, na região de baixo comprimento de onda (λ 200-350 nm).

Os valores de diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta das AgNPs estão apresentados na Figura 28 e na Tabela 5. A estabilidade físico-química das nanopartículas foi avaliada ao longo de 120 dias, em intervalos de 30 dias. Após a síntese, as nanopartículas apresentaram diâmetro médio de 183,3 nm, distribuição de tamanho de 0,543 e potencial Zeta de -28,3 mV.

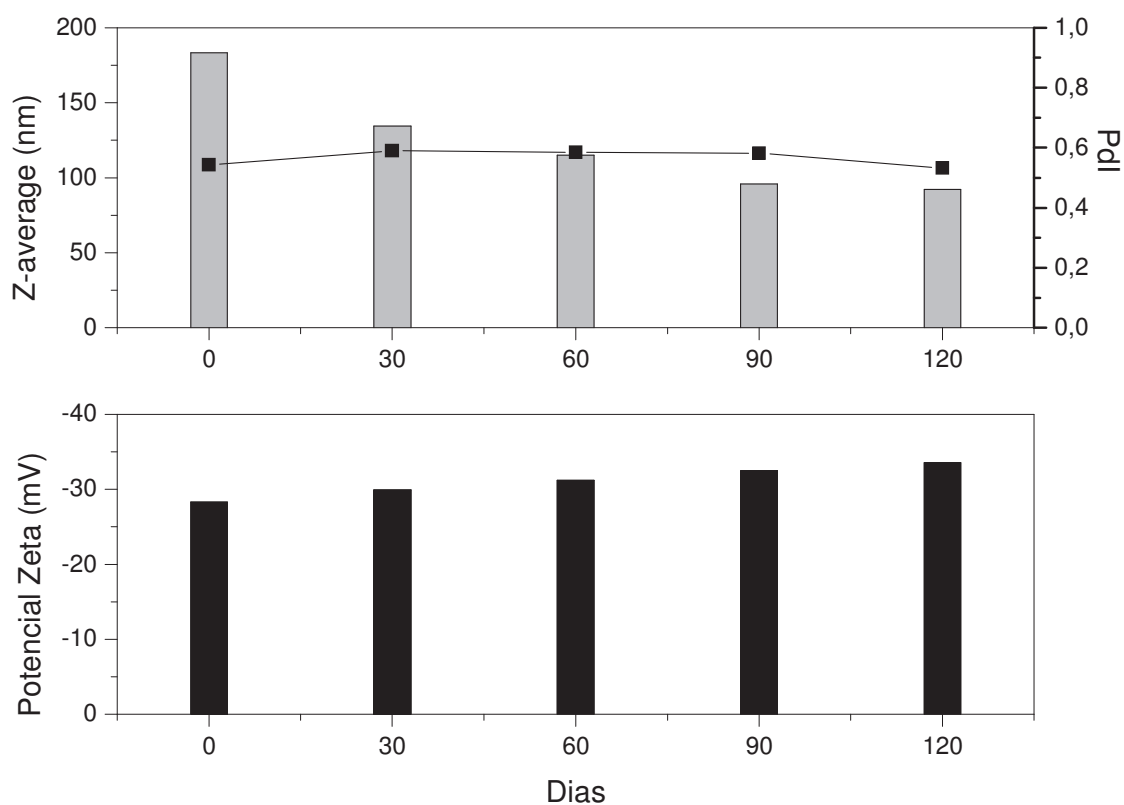


Figura 28 - Estabilidade físico-química de AgNPs armazenadas em temperatura ambiente e sob proteção da luz, imediatamente após o preparo (dia 0) e ao longo de 120 dias. Barras indicam diâmetro médio (acima) e potencial Zeta (abaixo). Linhas indicam distribuição de tamanho (Pdl).

Tabela 5 – Diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta de AgNPs ao longo de 120 dias

Tempo (dias)	DM (nm)	Pdl	Zeta (mV)
0	183,3	0,543	-28,3
30	134,3	0,590	-29,9
60	115,0	0,585	-31,2
90	95,7	0,581	-32,5
120	92,3	0,533	-33,6

DM = diâmetro médio (avaliado por intensidade de luz espalhada); Pdl = distribuição de tamanho

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que houve uma diminuição no diâmetro médio das nanopartículas em função do tempo. Esta diminuição pode ser devida a mudanças na capa proteica presente na superfície das nanopartículas, a qual é responsável pela estabilização das mesmas e pode apresentar um diâmetro estimado de mais de 100 nm, uma vez que as nanopartículas apresentaram um diâmetro médio inferior a 10 nm após análise por MET – como discutido adiante. Desta forma, qualquer alteração na capa de estabilização das nanopartículas pode alterar o diâmetro médio obtido por espectroscopia de correlação de fótons. As nanopartículas também foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio através da técnica de *Nanoparticle Tracking Analysis*. O diâmetro médio obtido foi de $151,0 \pm 94,0$ nm ($2,92 \times 10^8$ partículas/mL). As AgNPs obtidas por Ghaseminezhad *et al.* (2012), produzidas por método biotecnológico, foram um pouco menores (84,0 nm) e também mostraram-se estáveis por um longo período de tempo. A Figura 29 mostra uma imagem obtida do vídeo em tempo real do movimento Browniano das AgNPs, na qual é possível observar nanopartículas esféricas e homogêneas.

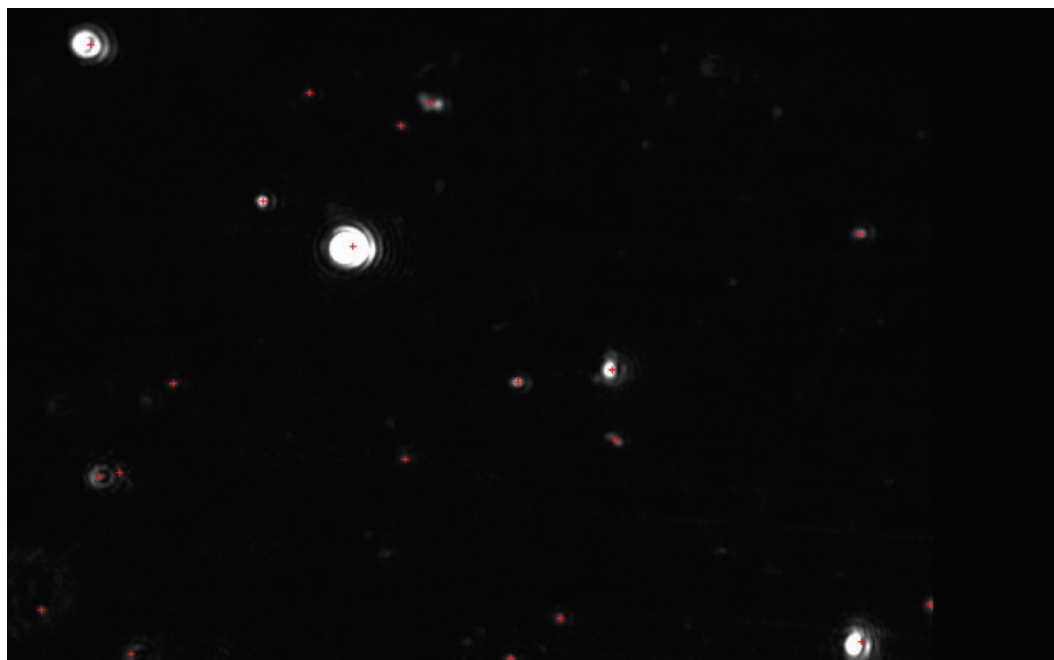


Figura 29 - Imagem obtida do vídeo, em tempo real, do movimento Browniano de AgNPs.

A imagem obtida por MET também mostrou partículas esféricas e homogêneas (Figura 30). O diâmetro médio obtido foi de $7,3 \pm 3,0$ nm – expressivamente menor que os diâmetros médios obtidos por espectroscopia de correlação de fótons (ECF). Este resultado é coerente, já que a ECF mensura o raio hidrodinâmico das nanopartículas; ou seja, nanopartículas mais capa proteica de estabilização – fazendo com que o diâmetro obtido seja maior que o diâmetro real (DURÁN *et al.*, 2007).

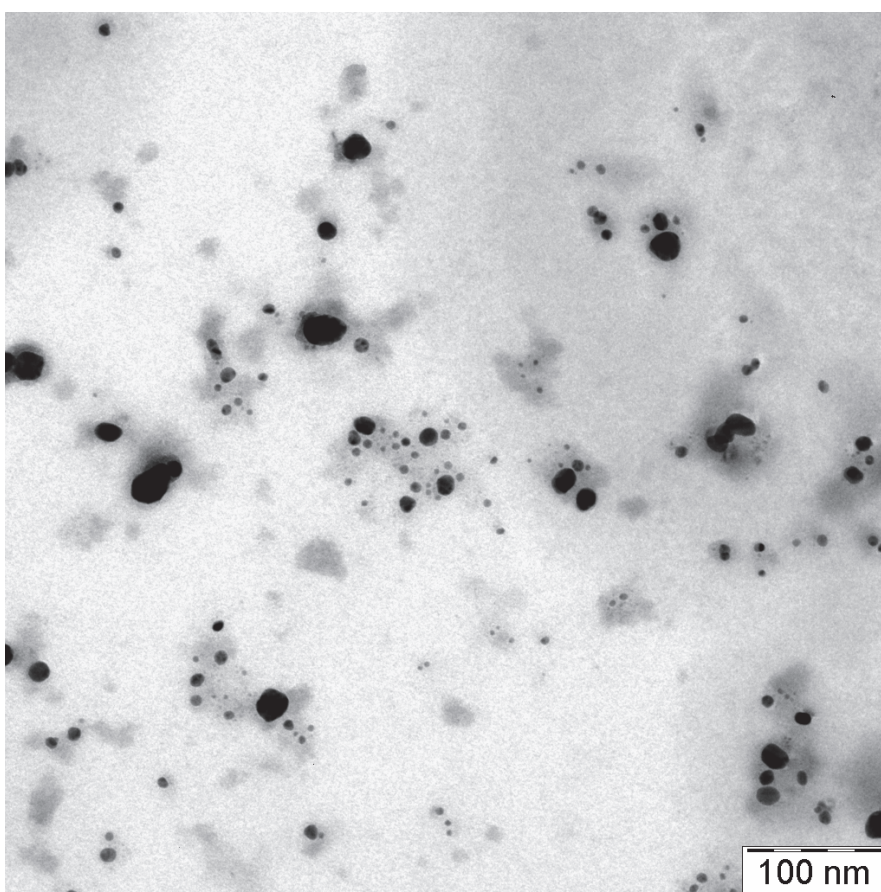


Figura 30 - Imagem obtida por MET de AgNPs sintetizadas por método biológico utilizando-se o fungo *Fusarium oxysporum*.

Nanopartículas de prata produzidas por método biotecnológico podem apresentar vários diâmetros, dependendo da espécie de fungo e da cepa utilizadas. No estudo de Pandiarajan *et al.* (2010), foram obtidas AgNPs com diâmetros entre 20,0 e 70,0 nm; semelhantes aos obtidos por Durán *et al.* (2005), os quais apresentaram-se entre 20,0 e 50,0 nm. Em contrapartida, Ahmad *et al.* (2003) obtiveram AgNPs com diâmetros menores (entre 5,0 e 50,0 nm), similarmente aos obtidos neste estudo. Nossos resultados demonstraram que a cepa 551 do *Fusarium oxysporum* produz nanopartículas de prata esféricas, homogêneas e estáveis por longos períodos, de maneira economicamente viável para produção em larga escala.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que as AG/CS não foram adequadas para a administração de GSNO, por apresentarem uma baixa eficiência de encapsulação ($18,6 \pm 6,8\%$) e, principalmente, por não se apresentarem como um sistema de liberação sustentada – uma vez que a porcentagem de GSNO encapsulado, 24 horas após a preparação, foi praticamente 0%. Desta forma, apesar dos resultados satisfatórios em relação ao diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial Zeta, a baixa EE e a rápida liberação de GSNO a partir das AG/CS foram determinantes para a não utilização destas nanopartículas nos estudos *in vivo* posteriores. Os estudos de toxicidade *in vitro* foram realizados, com o intuito de avaliar os possíveis efeitos citotóxicos destas nanopartículas, uma vez que suas características físico-químicas e sua eficiência de encapsulação podem ser aprimoradas ajustando-se as condições da formulação, através da incorporação de materiais adicionais nas etapas de preparação ou de mudanças no método de preparo.

Em relação às PCL/CS, o volume final da dispersão mais adequado foi 10 mL, permitindo maior concentração de GSNO e, conseqüentemente, menor volume necessário para se obter a concentração desejada no gel aplicado posteriormente nos estudos com animais. As nanopartículas foram preparadas com 20 mg de GSNO, permitindo assim uma encapsulação final de cerca de 12 mg de GSNO (quantidade igualmente utilizada nos estudos com GSNO livre).

4.3 Avaliação do Potencial Citotóxico de GSNO e das Nanopartículas

4.3.1 S-Nitrosoglutathione (GSNO)

Os efeitos citotóxicos de GSNO livre avaliados em células V79 e em hepatócitos estão apresentados na Figura 31. Em células V79, os efeitos foram concentração-dependentes até a concentração de 300 μM . A partir desta concentração, os efeitos se mantiveram relativamente constantes até a máxima concentração avaliada (1000 μM); na qual houve uma redução de 12,45% na capacidade de incorporação do corante vermelho neutro (VN), 33,75% na capacidade de redução do MTT e 22,85% no conteúdo de ácidos nucleicos. Nos ensaios de incorporação do VN e conteúdo de ácidos nucleicos realizados em hepatócitos, os efeitos citotóxicos mantiveram-se relativamente constantes até a concentração de 60 μM . A partir desta concentração, os efeitos foram concentração-dependentes até a máxima concentração avaliada (500 μM); na qual houve uma redução de 14,46% na capacidade de incorporação do VN e de 13,83% no conteúdo de ácidos nucleicos. No ensaio de redução do MTT, os efeitos foram concentração-dependentes até a máxima concentração avaliada (500 μM); na qual houve uma redução de 63,60% na viabilidade celular ($\text{IC}_{50} = 476,8 \mu\text{M}$).

Os resultados obtidos indicam que o GSNO é citotóxico apenas em elevadas concentrações, o que possibilita sua utilização em aplicações biomédicas. Entretanto, a citotoxicidade parece depender da linhagem celular utilizada, uma vez que as células V79 apresentaram-se um pouco mais resistentes ao composto que os hepatócitos, e do tempo de exposição das células ao composto. Em células EA.hy926 (endoteliais), por exemplo, a concentração de 1000 μM foi responsável por uma redução na capacidade de redução do MTT maior que a observada em nosso estudo (50% *versus* 33,75%); e quando o tempo de exposição foi aumentado para 48 horas, esta redução foi aumentada para 60% (LIU *et al.*, 2010). Sexton *et al.* (1994) também observaram que a concentração provável de GSNO que afetou 50% de células HL-60 (células humanas de leucemia promielocítica) foi diminuída com o aumento do tempo de exposição, de 1700 μM após 2h de exposição para 410 μM após exposição contínua.

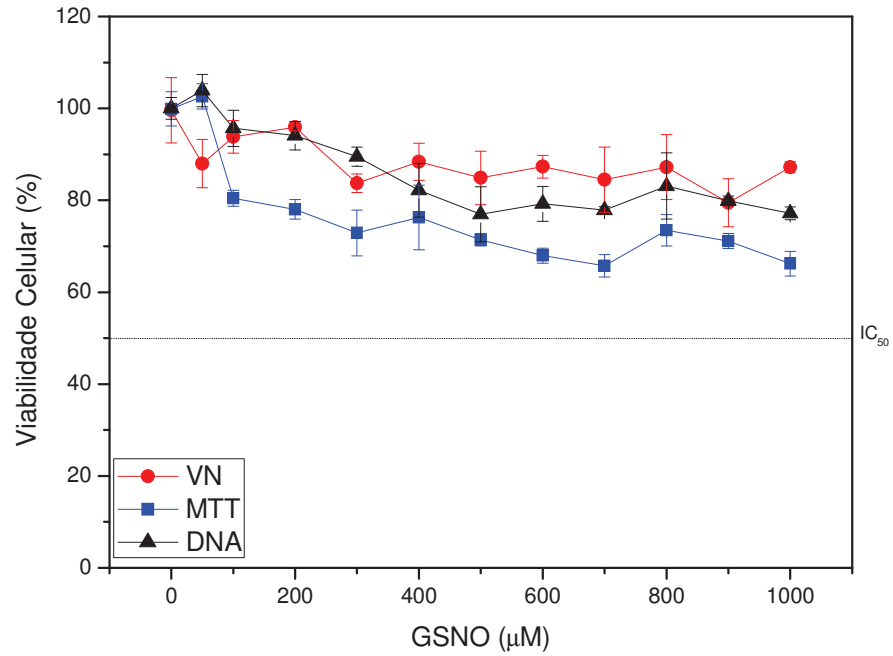
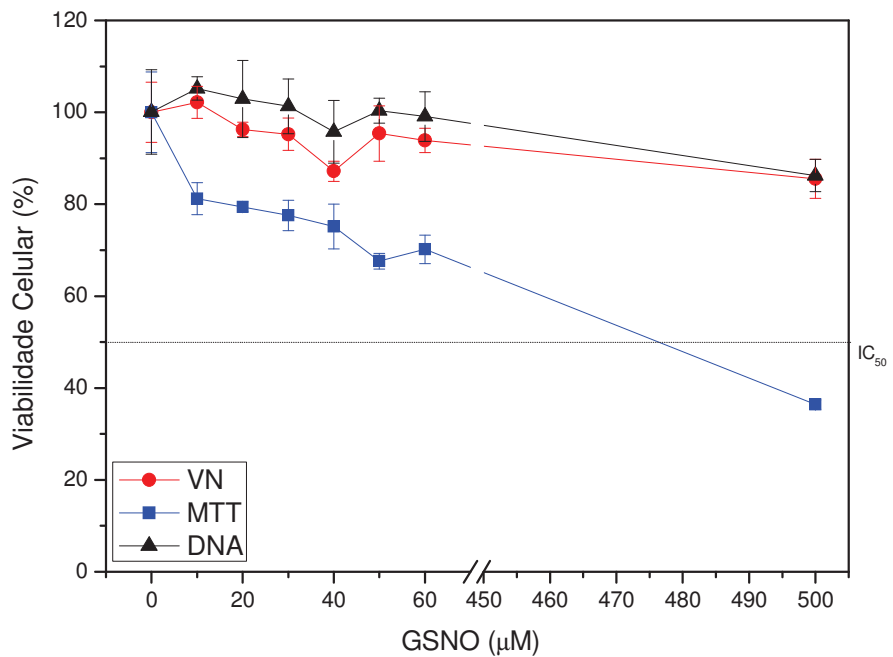
A**B**

Figura 31 - Viabilidade de células V79 (A) e hepatócitos (B) após tratamento com GSNO livre por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

4.3.2 Nanopartículas de Alginato-Quitosana (AG/CS) Contendo GSNO

A fim de garantir que os efeitos observados nos ensaios com GSNO encapsulado não foram devidos ao “veículo” utilizado, ensaios com as nanopartículas sem GSNO foram realizados. Os efeitos citotóxicos de AG/CS e AG/CS contendo GSNO avaliados em células V79 estão apresentados na Figura 32. No ensaio de incorporação do VN, as AG/CS foram responsáveis por uma redução de 7,9% na viabilidade celular; enquanto que as AG/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 12,03%. A maior citotoxicidade das AG/CS contendo GSNO pode estar relacionada à citotoxicidade do composto, o qual foi responsável por uma redução de 11,67% na viabilidade das células (Figura 31 A, p. 91). Neste sentido, a encapsulação do GSNO não diminuiu sua citotoxicidade.

No ensaio de redução do MTT, as AG/CS praticamente não afetaram a viabilidade das células (0,5%); enquanto que as AG/CS contendo GSNO foram responsáveis por um estímulo de 35,55%. Este estímulo pode estar relacionado a um aumento da atividade enzimática, aumentando a redução do MTT a formazan. Estudos com hepatócitos intactos sugerem que a redução do MTT avalia predominantemente o balanço $[NAD(P)^+] / [NAD(P)H]$ (MELO *et al.*, 2002). Entretanto, o MTT não é reduzido somente na mitocôndria, mas também em endossomas e lisossomas, e não se difunde pela membrana, sendo internalizado através de endocitose – enquanto sua forma reduzida (formazan) primeiramente se acumula no compartimento endossomal ou lisossomal e, em seguida, é transportada até a superfície da célula através de exocitose (BERNHARD *et al.*, 2003). Sendo assim, fatores que afetem a endocitose do MTT, a exocitose do formazan e/ou a atividade da succinato desidrogenase podem afetar também a redução do MTT.

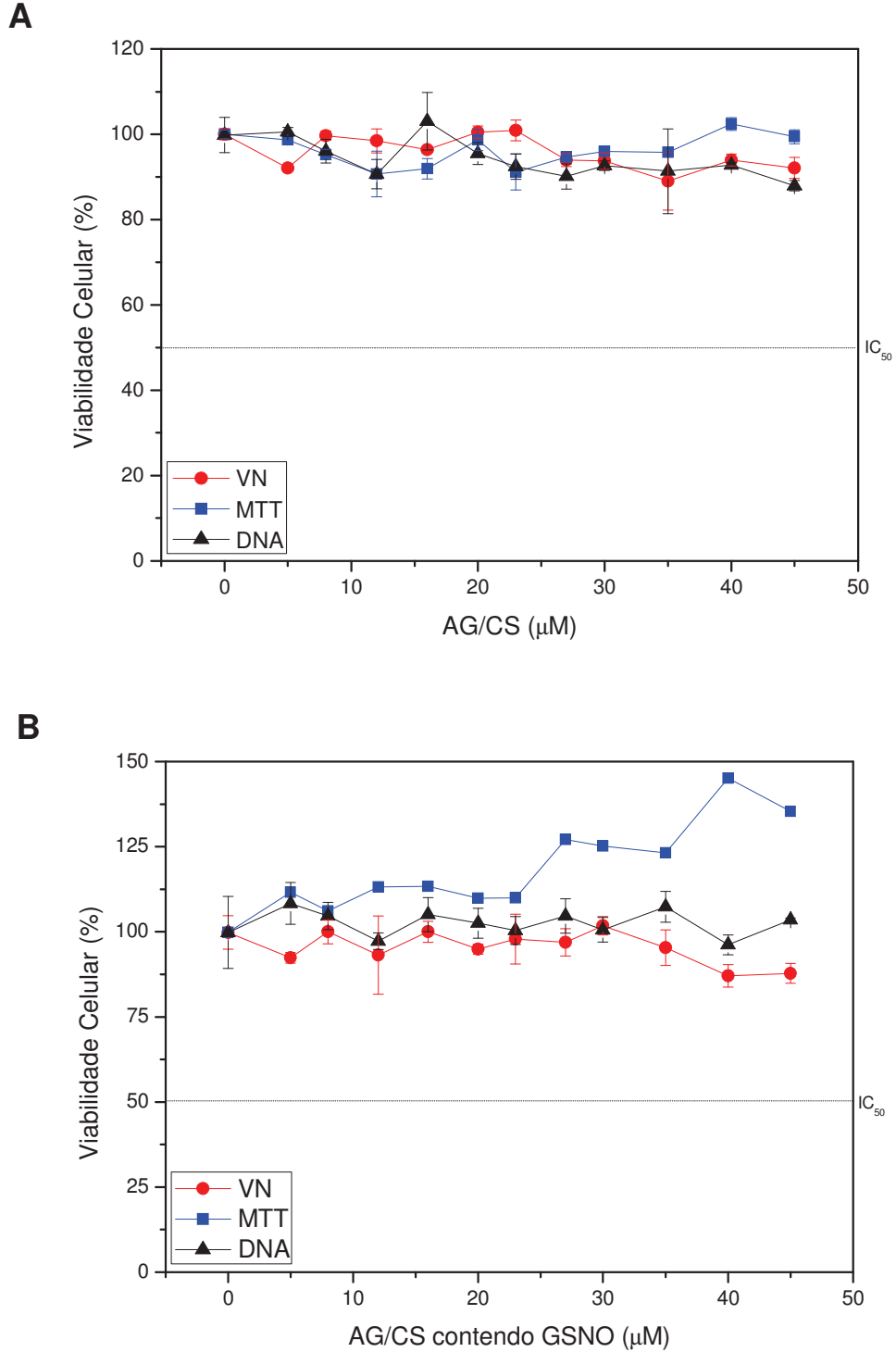


Figura 32 - Viabilidade de células V79 após tratamento com AG/CS (A) e AG/CS contendo GSNO (B) por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

No ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos, as AG/CS foram responsáveis por uma redução de 11,9% na viabilidade celular; enquanto que as AG/CS contendo GSNO estimularam a viabilidade em 3,72%. Neste caso, a encapsulação do GSNO parece ter diminuído a citotoxicidade das nanopartículas e o estímulo observado pode ser devido ao GSNO, o qual estimulou a viabilidade das células em 3,88% (Figura 31 A, p. 91). Este estímulo observado pode estar relacionado a uma maior adesão das células às placas ou a um aumento da proliferação celular. Em células HeLa (células humanas do câncer de colo do útero), AG/CS recobertas com Pluronic F127 também se apresentaram pouco citotóxicas para células V79 (DAS, KASOJU & BORA, 2010).

Os efeitos citotóxicos de AG/CS e AG/CS contendo GSNO avaliados em células 3T3 estão apresentados na Figura 33. No ensaio de incorporação do corante VN, as AG/CS foram responsáveis por uma redução de 10,66% na viabilidade celular; enquanto que as AG/CS contendo GSNO praticamente não afetaram a viabilidade das células. Estes resultados sugerem que a encapsulação do GSNO diminuiu a citotoxicidade das nanopartículas. Resultados semelhantes foram observados no ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos – as AG/CS foram responsáveis por uma redução de 9,4% na viabilidade celular; enquanto que as AG/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 4,26%. Entretanto, ao contrário dos resultados obtidos nestes ensaios, no ensaio de redução do MTT, as AG/CS praticamente não alteraram a capacidade de redução do MTT (redução de 0,13%); enquanto que as AG/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 16,70% na viabilidade celular. Neste caso, a encapsulação do composto parece ter provocado uma maior citotoxicidade nas células. De modo geral, as AG/CS (contendo ou não GSNO) foram pouco citotóxicas para as células 3T3. No estudo de Grillo *et al.* (2010), as AG/CS também se apresentaram pouco citotóxicas a células 3T3.

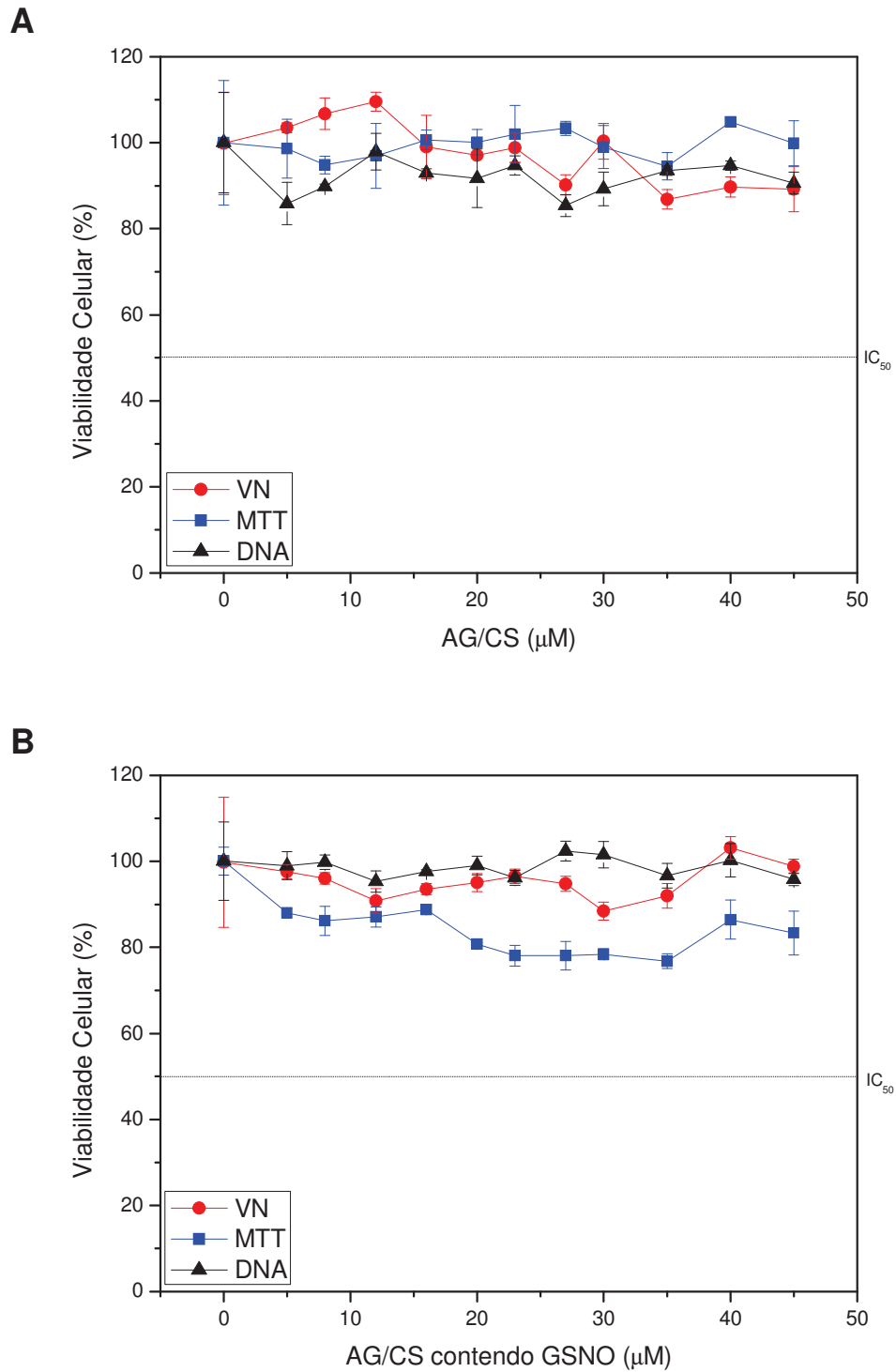


Figura 33 - Viabilidade de células 3T3 após tratamento com AG/CS (A) e AG/CS contendo GSNO (B) por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Os efeitos citotóxicos das AG/CS contendo GSNO avaliados em hepatócitos estão apresentados na Figura 34. Em relação ao ensaio de incorporação do corante VN, os efeitos citotóxicos foram concentração-dependentes até a máxima concentração avaliada (60 μM), na qual houve uma redução de 30,72% na viabilidade celular. Os efeitos citotóxicos observados nos ensaios de redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos mantiveram-se relativamente constantes até a concentração de 40 μM – tornando-se concentração-dependentes a partir desta concentração e até a máxima concentração avaliada, na qual houve uma redução de 52,28% na capacidade de redução do MTT ($\text{IC}_{50} = 59,35 \mu\text{M}$) e de 25,25% no conteúdo de ácidos nucleicos. Estes resultados indicam que a encapsulação do GSNO aumentou sua citotoxicidade, uma vez que o composto livre foi responsável por uma redução de 8,50% na capacidade de incorporação do VN; 28,70% na capacidade de redução do MTT e 1,83% no conteúdo de ácidos nucleicos (Figura 31 B, p. 91).

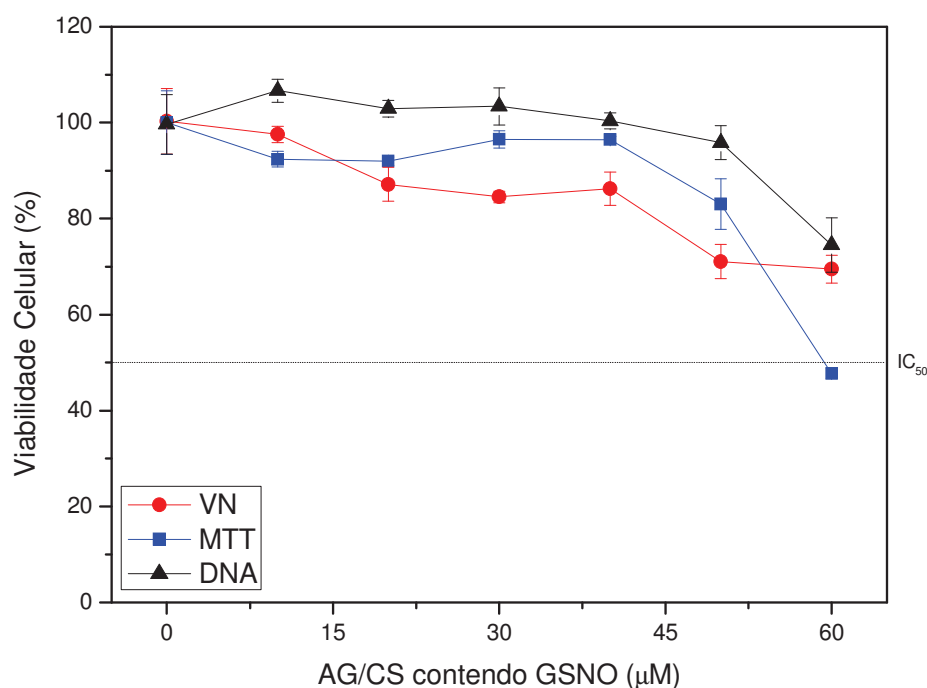


Figura 34 - Viabilidade de hepatócitos após tratamento com AG/CS contendo GSNO por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que as AG/CS contendo GSNO apresentaram-se pouco citotóxicas para células V79 e 3T3. Em hepatócitos, as nanopartículas apresentaram uma maior citotoxicidade, inviabilizando mais de 50% das células no ensaio de redução do MTT. A alta capacidade de biotransformação do fígado permite uma eficiente eliminação de compostos tóxicos; entretanto, faz deste órgão o principal órgão lesado pela toxicidade dos compostos. O efeito citotóxico observado no ensaio de redução do MTT provavelmente não indica menor número de células, uma vez que as mesmas parecem estar viáveis, mantendo-se aderidas e incorporando o VN – apresentando apenas alterações na capacidade mitocondrial para reduzir o MTT. Isto indica que a biotransformação hepática do GSNO provavelmente produziu um ou mais metabólitos com efeitos tóxicos a nível mitocondrial, o que poderia ser considerado como uma citotoxicidade seletiva (SEIBERT *et al.*, 1996; WALUM *et al.*, 1996).

4.3.3 Nanopartículas de PCL Recobertas por Quitosana (PCL/CS) e Contendo GSNO

Os efeitos citotóxicos das PCL/CS e PCL/CS contendo GSNO avaliados em células V79 estão apresentados na Figura 35. No ensaio de incorporação do VN, as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 2,3% na viabilidade celular; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO não afetaram a viabilidade. Estes resultados sugerem que a encapsulação do GSNO diminuiu a citotoxicidade das nanopartículas e do composto – o qual foi responsável por uma redução de 11,67% na capacidade das células em incorporar o VN (Figura 31 A, p. 91). Resultados semelhantes foram observados no ensaio de redução do MTT – as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 13% na viabilidade celular; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 7,2%. Células V79 parecem ser mais sensíveis às PCL/CS que células HeLa e OCM-1 (células de melanoma uveal) – nestas células, embora a máxima concentração avaliada tenha sido maior que a avaliada em nosso estudo, a diminuição na capacidade de redução do MTT foi cerca de 2,5 vezes menor (LIU *et al.*, 2012). No ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos, as PCL/CS foram responsáveis por um estímulo de 6,75%; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO

não afetaram a viabilidade das células. Este estímulo observado pode estar relacionado a uma maior adesão das células às placas ou a um aumento da proliferação celular.

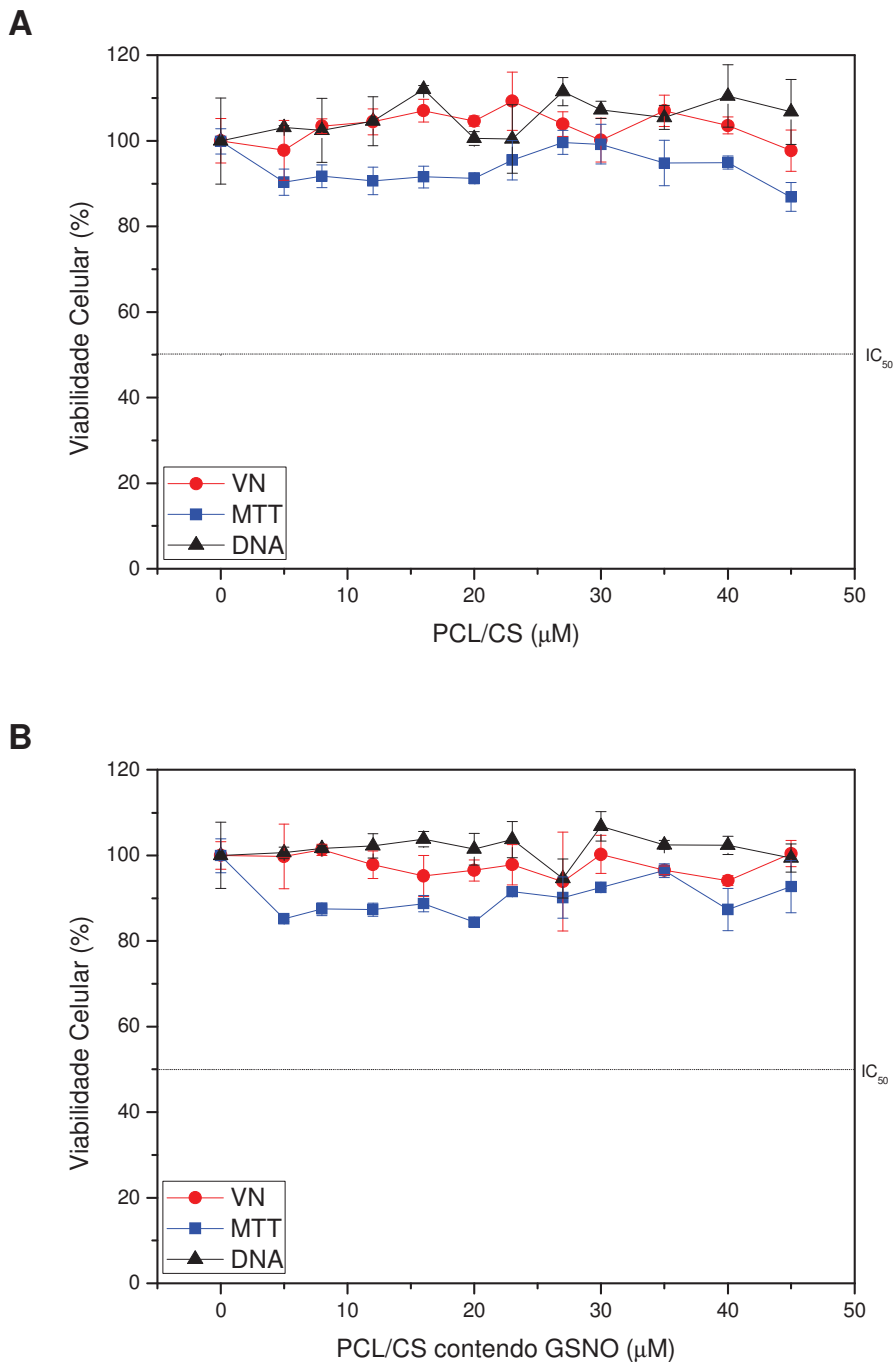


Figura 35 - Viabilidade de células V79 após tratamento com PCL/CS (A) e PCL/CS contendo GSNO (B) por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Os efeitos citotóxicos das PCL/CS e PCL/CS contendo GSNO avaliados em células 3T3 estão apresentados na Figura 36. No ensaio de incorporação do VN, as PCL/CS foram responsáveis por uma redução pouco significativa (1,47%) na viabilidade celular; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 14,03%. Resultados semelhantes foram observados no ensaio de redução do MTT – as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 4,67% na viabilidade celular; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 9,43%. Estes resultados sugerem que a encapsulação do GSNO aumentou a citotoxicidade das nanopartículas. O ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos, por sua vez, apresentou uma diferença pouco significativa entre as nanopartículas – as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 8,81% na viabilidade celular; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 7,72%.

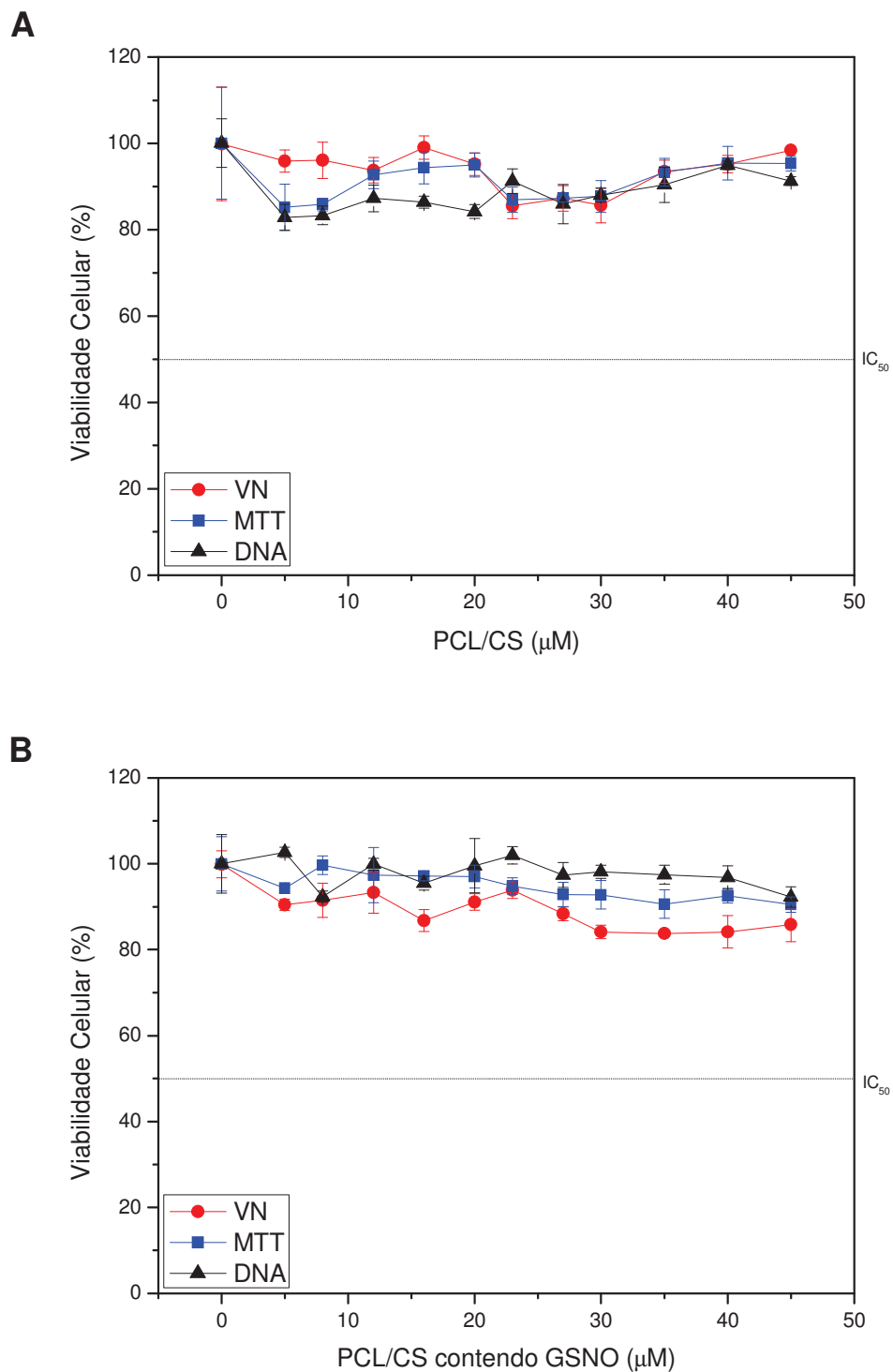


Figura 36 - Viabilidade de células 3T3 após tratamento com PCL/CS (A) e PCL/CS contendo GSNO (B) por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Os efeitos citotóxicos das PCL/CS e PCL/CS contendo GSNO avaliados em hepatócitos estão apresentados na Figura 37. No ensaio de incorporação do VN, as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 36,50% na viabilidade celular; enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 57,35% ($IC_{50} = 40 \mu M$). Resultados semelhantes foram observados no ensaio de redução do MTT, no qual as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 55,62% na viabilidade celular ($IC_{50} = 486,2 \mu M$), enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 77,8% ($IC_{50} = 432,5 \mu M$); e no ensaio de conteúdo de ácidos nucleicos, no qual as PCL/CS foram responsáveis por uma redução de 32,31% na viabilidade celular, enquanto que as PCL/CS contendo GSNO foram responsáveis por uma redução de 37,35%. Estes resultados sugerem que a encapsulação do GSNO aumentou a citotoxicidade das nanopartículas. Entretanto, esta maior citotoxicidade deve ser devida à citotoxicidade do GSNO, o qual foi responsável por uma redução de 8,5% na capacidade de incorporação do VN; 28,7% na capacidade de redução do MTT e 1,83% no conteúdo de ácidos nucleicos (Figura 31 B, p. 91).

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que as PCL/CS e as PCL/CS contendo GSNO apresentaram-se pouco citotóxicas para células V79 e 3T3. Em hepatócitos, as nanopartículas apresentaram uma alta citotoxicidade, inviabilizando mais de 50% das células no ensaio de redução do MTT. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com as AG/CS contendo GSNO e sugerem que a biotransformação hepática das PCL/CS (contendo ou não GSNO) provavelmente produziu um ou mais metabólitos com efeitos tóxicos a nível mitocondrial.

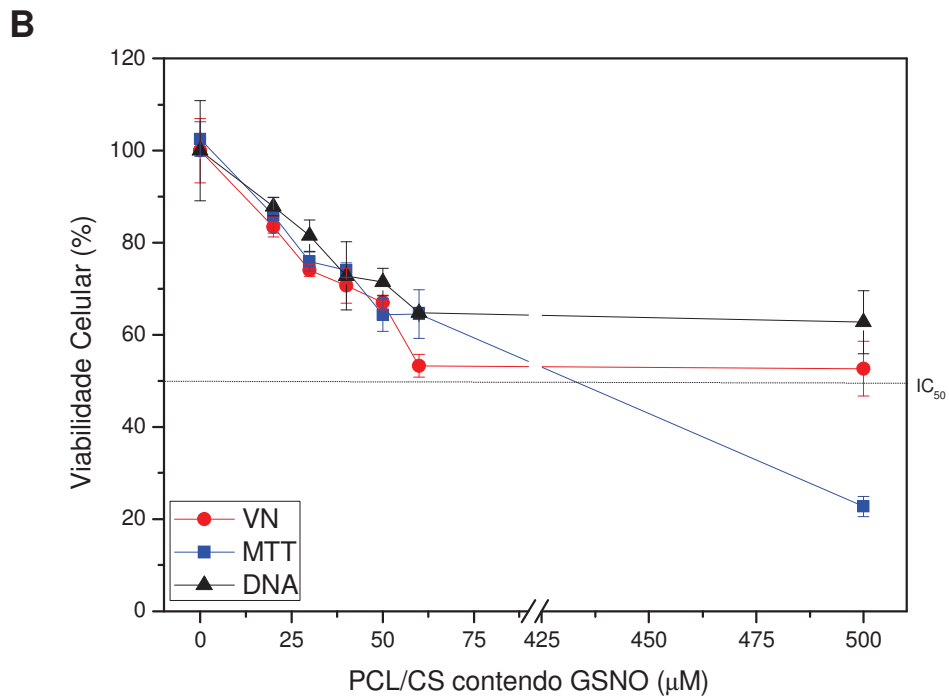
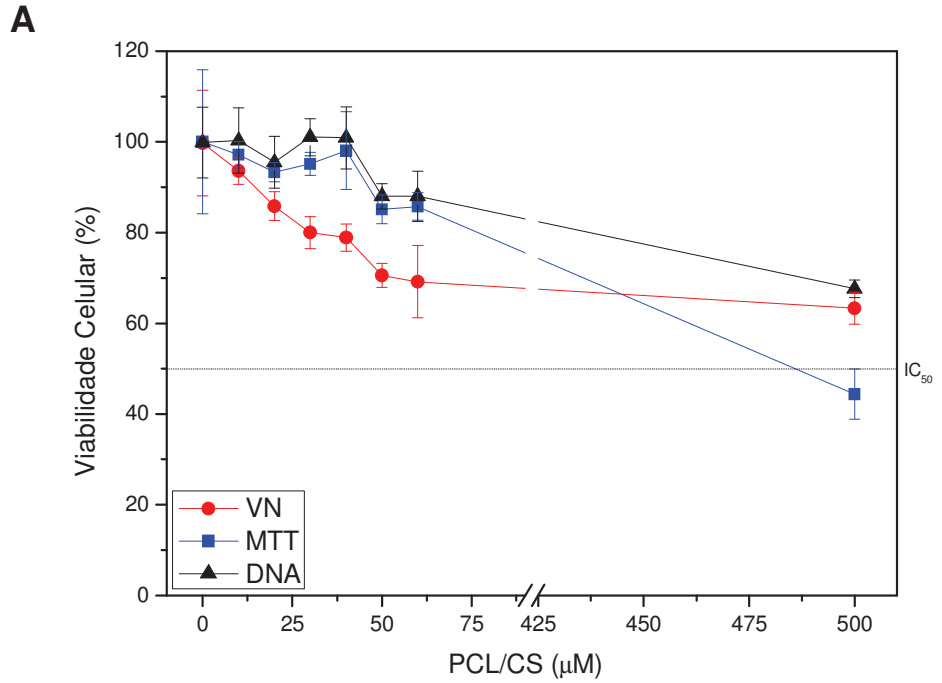


Figura 37 - Viabilidade de hepatócitos após tratamento com PCL/CS (A) e PCL/CS contendo GSNO (B) por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

4.3.4 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

Os resultados dos ensaios realizados com AgNPs em células V79 estão apresentados na Figura 38. A partir dos resultados obtidos, é possível observar que as AgNPs apresentaram baixa citotoxicidade às células até a concentração de 35 μM . A partir desta concentração, os efeitos foram concentração-dependentes até a máxima concentração avaliada (45 μM); na qual houve redução de 61,12% na capacidade de incorporação do VN ($\text{IC}_{50} = 43,15 \mu\text{M}$), 34,30% na capacidade de redução do MTT e 46,72% no conteúdo de ácidos nucleicos. No estudo de Zhang *et al.* (2012), a citotoxicidade das AgNPs também foi concentração-dependente no ensaio de redução do MTT – na máxima concentração avaliada (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a viabilidade celular foi reduzida em 80%. Células V79 parecem ser mais sensíveis à toxicidade das AgNPs que linfócitos humanos – nestas células, a viabilidade celular foi reduzida significativamente a partir de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o valor de IC_{50} foi de cerca de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (GHOSH *et al.*, 2012).

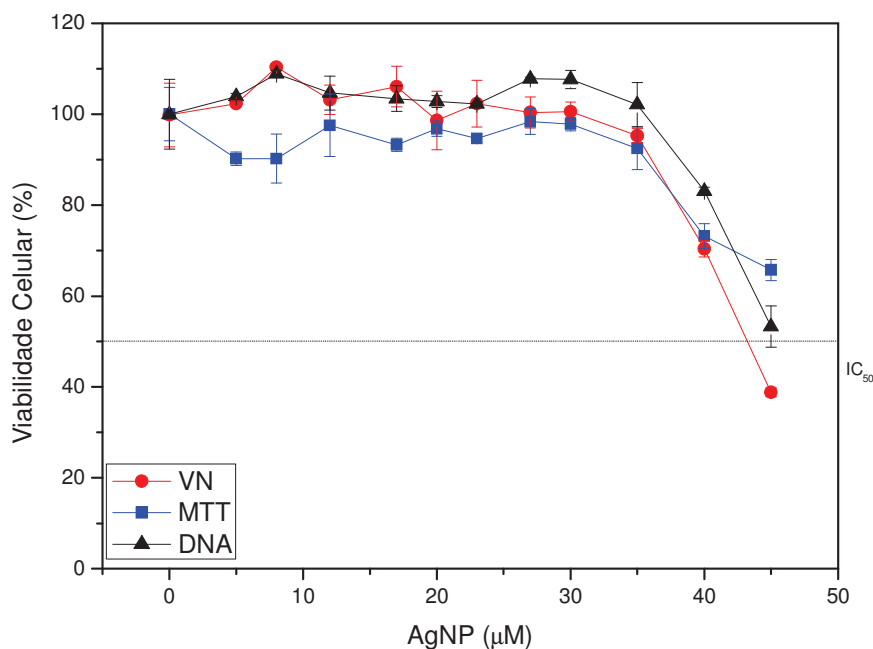


Figura 38 - Viabilidade de células V79 após tratamento com AgNPs por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Na Figura 39, estão apresentados os efeitos citotóxicos das AgNPs em células 3T3. A viabilidade celular manteve-se relativamente constante até a concentração de 16 μM . A partir desta concentração, a redução da viabilidade foi concentração-dependente até a concentração de 23 μM , mantendo-se constante até a máxima concentração avaliada (45 μM) – na qual houve redução de 50,5% na capacidade de incorporação do VN ($\text{IC}_{50} = 22,35 \mu\text{M}$); 66% na capacidade de redução do MTT ($\text{IC}_{50} = 21,4 \mu\text{M}$) e 54,55% no conteúdo de ácidos nucleicos ($\text{IC}_{50} = 22,45 \mu\text{M}$).

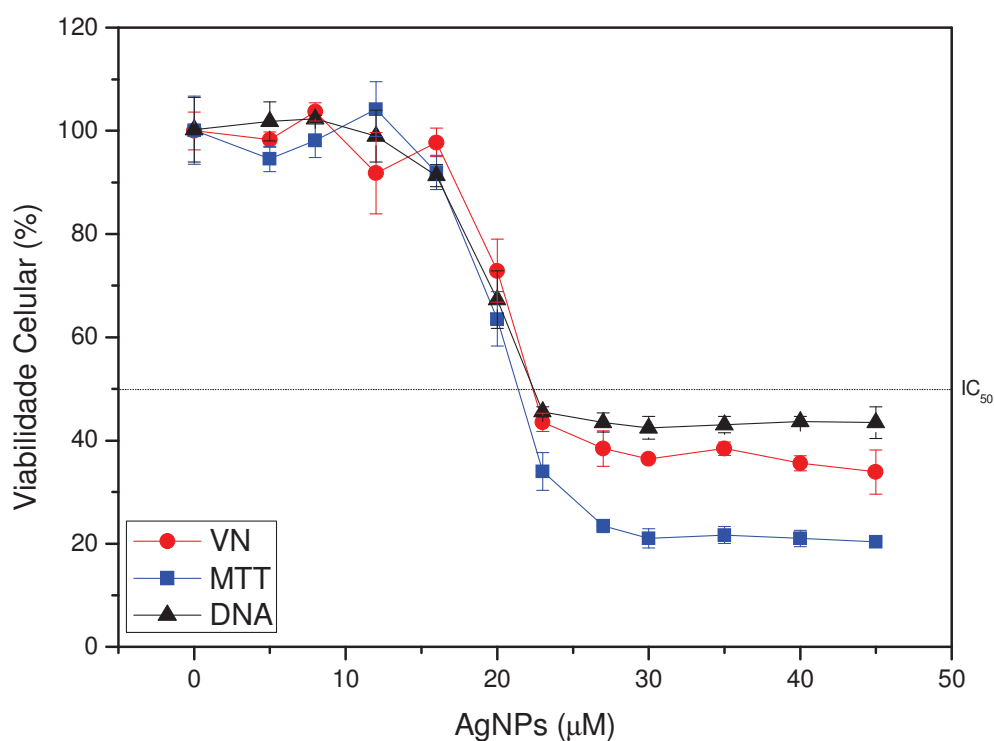


Figura 39 - Viabilidade de células 3T3 após tratamento com AgNPs por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

Os resultados obtidos indicam que as células 3T3 são mais sensíveis à citotoxicidade das AgNPs quando comparadas às células V79, uma vez o IC₅₀ destas células foi praticamente o dobro do IC₅₀ das células 3T3. Em relação ao ensaio de redução do MTT, nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por Hsin *et al.* (2008), os quais estudaram os efeitos citotóxicos de AgNPs comercialmente disponíveis sob a forma de pó, em células 3T3 e A10 (células de músculo liso vascular). As nanopartículas foram responsáveis por uma redução de 50% na viabilidade das células A10 e de cerca de 60% na viabilidade das células 3T3, na concentração de 50 µg/mL. Em outro estudo, esta citotoxicidade concentração-dependente também foi observada – na concentração de 1:6 (v/v) nanopartículas/meio de cultura, as AgNPs foram responsáveis por uma redução de 35% na viabilidade celular após 48 horas; enquanto que na concentração de 2:3 (v/v) nanopartículas/meio de cultura, a viabilidade foi reduzida em 50% já nas primeiras 12 horas (CHUNG, CHEN & CHEN, 2008). Por outro lado, Travan *et al.* (2009) não observaram efeitos citotóxicos de microesferas formadas por um hidrogel (composto de alginato e quitosana lactose-modificada) contendo AgNPs no ensaio de redução do MTT, em células 3T3. Entretanto, a concentração de prata liberada pelas microesferas foi muito baixa (58 µg/L), o que pode explicar a ausência de citotoxicidade observada.

Os resultados dos ensaios realizados com AgNPs em hepatócitos estão apresentados na Figura 40. A partir dos resultados obtidos, é possível observar que os efeitos citotóxicos foram concentração-dependentes até a concentração de 20 µM. A partir desta concentração, os efeitos mantiveram-se relativamente constantes até a máxima concentração avaliada (50 µM); na qual houve uma redução de 35,37% na capacidade de incorporação do VN; 65,62% na capacidade de redução do MTT (IC₅₀ = 12,8 µM) e 25,25% no conteúdo de ácidos nucleicos. A citotoxicidade das AgNPs pode ser devido tanto à sua forma e ao seu tamanho reduzido, quanto à liberação, na água, de íons de prata (Ag⁺) – os quais possuem propriedades antibacterianas e outras propriedades destrutivas (DAMM & MUNSTEDT, 2008). Em contato com meio de cultura ou proteínas do citoplasma, a oxidação da superfície das AgNPs provavelmente libera íons Ag⁺, ampliando a citotoxicidade destas nanopartículas (ZHANG *et al.*, 2012).

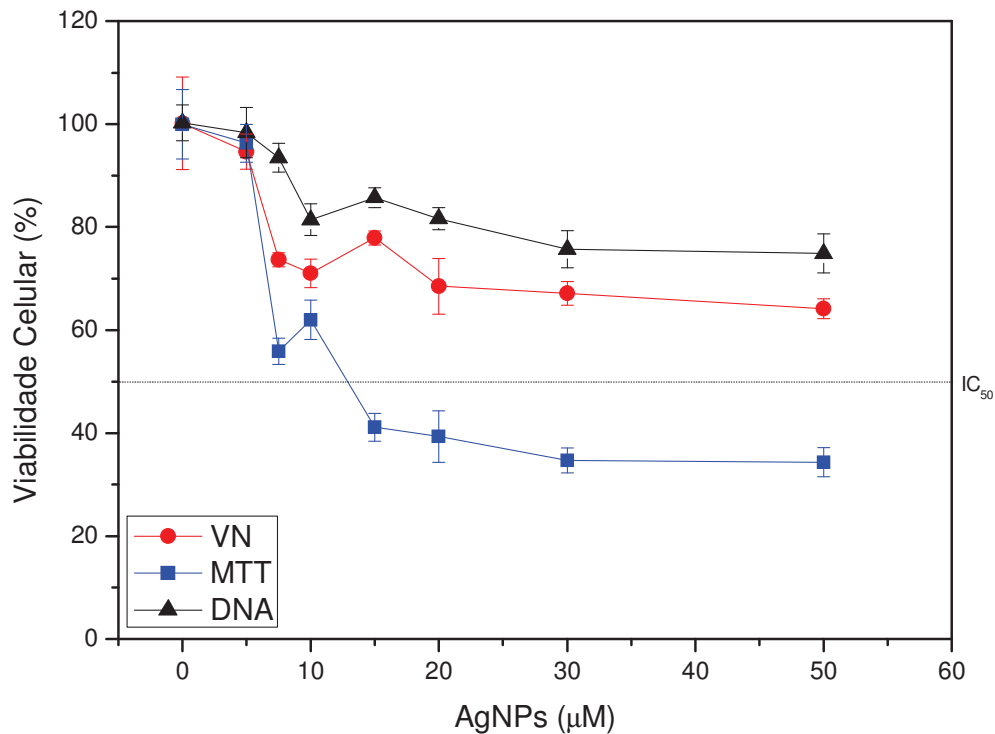


Figura 40 - Viabilidade de hepatócitos após tratamento com AgNPs por 24 horas. Parâmetros analisados: incorporação do corante vermelho neutro (VN), redução do MTT e conteúdo de ácidos nucleicos. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três experimentos em sextuplicata cada.

A Tabela 6 mostra os valores de IC_{50} dos compostos estudados para os três tipos celulares avaliados. De modo geral, o GSNO livre e as nanopartículas poliméricas (contendo ou não GSNO) não foram citotóxicos às células V79 e 3T3; uma vez que a redução na viabilidade celular foi menor que 50%. Em hepatócitos, a citotoxicidade dos compostos foi maior, provavelmente devido à biotransformação dos mesmos (produzindo um ou mais metabólitos com efeitos tóxicos). Entretanto, a citotoxicidade observada se deu em concentrações bastante elevadas. As AgNPs apresentaram-se citotóxicas em concentrações relativamente baixas e para os três tipos celulares avaliados. Entretanto, estas nanopartículas possuem um elevado potencial para emprego no tratamento de feridas e foram pouco tóxicas *in vivo* (como discutido no item

4.4). Sendo assim, mais estudos sobre a citotoxicidade das AgNPs, em diferentes concentrações e tipos celulares, são necessários e relevantes.

Tabela 6 – Valores de IC₅₀ de GSNO livre, nanopartículas poliméricas (contendo ou não GSNO) e nanopartículas de prata, obtidos após ensaios de citotoxicidade realizados em células V79, 3T3 e hepatócitos

Composto	Células V79	Células 3T3	Hepatócitos
GSNO Livre	-	*	477,10 µM
AG/CS	-	-	*
AG/CS com GSNO	-	-	59,20 µM
PCL/CS	-	-	485,10 µM
PCL/CS com GSNO	-	-	432,55 µM
AgNPs	43,20 µM	21,40 µM	12,85 µM

- Valor de IC₅₀ não obtido (a redução na viabilidade celular foi menor que 50%)

* Ensaio não realizado

4.4 Avaliação do Potencial Tóxico de GSNO Livre e das Nanopartículas em Animais Induzidos à Queimadura Térmica

4.4.1 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

A análise de parâmetros bioquímicos e hematológicos é de fundamental importância na pesquisa científica por permitir com maior segurança a avaliação da homeostase e de modificações induzidas por processos patológicos, bem como de resultados obtidos em procedimentos experimentais provenientes de intervenções terapêuticas. A creatinina, uma substância proveniente da degradação de creatina fosforilada (fosfocreatina), por ser excretada exclusivamente pela urina, tornou-se um biomarcador quase universal para avaliação da filtração glomerular – auxiliando no diagnóstico e no monitoramento da progressão da insuficiência renal crônica. A ureia é outro biomarcador comumente utilizado para avaliação da filtração glomerular. É uma substância sintetizada no fígado a partir de dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3) e constitui o principal produto final do metabolismo proteico. É filtrada pelos rins e eliminada pela urina (maior parte) e pelo suor. A análise de ureia é menos específica que a análise de creatinina para a avaliação da função renal no geral, mas é mais sensível a alterações primárias das condições renais (sendo um importante marcador bioquímico em casos que envolvam esta condição). Os resultados das análises de creatinina e ureia dos animais tratados com os compostos estudados, durante os diferentes períodos de tratamento, estão apresentados na Figura 41.

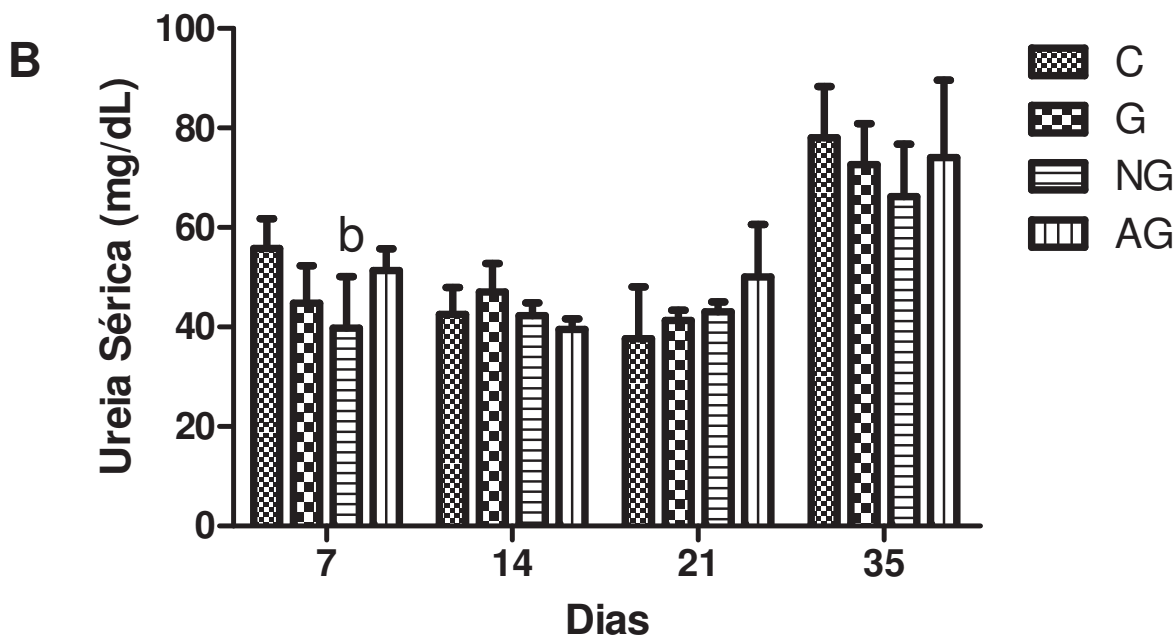
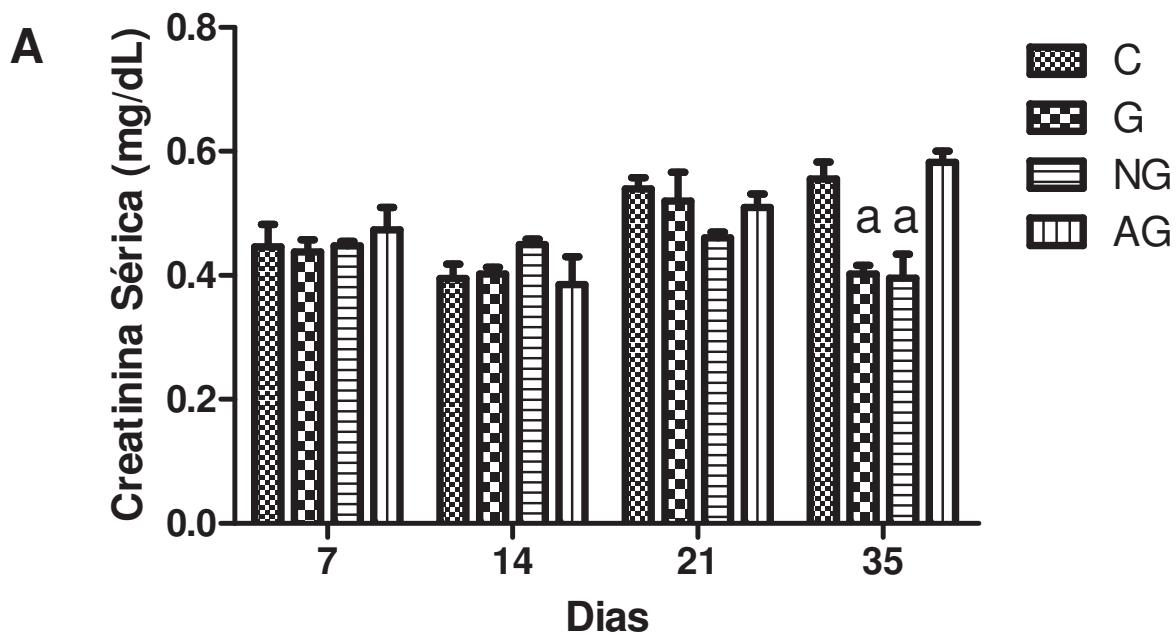


Figura 41 - Concentração sérica de creatinina (A) e ureia (B) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = p<0.001 quando comparado a (C); b = p<0.05 quando comparado a (C).

Em relação às análises de creatinina, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; com exceção dos grupos G e NG, tratados durante 35 dias, os quais apresentaram valores estatisticamente inferiores ($p < 0.001$) quando comparados ao grupo controle (C). Entretanto, todos os valores encontram-se dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre 0,40 mg/dL e 0,65 mg/dL) (DANTAS *et al.*, 2006; CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP, 2008; GIKNIS & CLIFFORD, 2008; SANTOS *et al.* 2010; MELO *et al.*, 2012), indicando que o tratamento com os compostos estudados não interferiu na excreção de creatinina e, conseqüentemente, na função renal dos animais.

Em relação às análises de ureia, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; com exceção do grupo NG, tratado durante 7 dias, o qual apresentou valores estatisticamente inferiores ($p < 0.05$) quando comparados ao grupo controle (C). Os valores dos grupos tratados durante 7, 14 e 21 dias encontram-se dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre 32,0 mg/dL e 55,0 mg/dL) (DANTAS *et al.*, 2006; CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; SANTOS *et al.* 2010; MELO *et al.*, 2012). Os valores dos grupos tratados durante 35 dias estão acima dos valores de referência. Esse aumento nos níveis séricos de ureia pode ser atribuído a condições temporárias, como desidratação, ou patológicas, como queimaduras. A desidratação provoca uma redução do fluxo tubular, conseqüentemente elevando os níveis séricos de ureia. Já em casos de queimadura, o aumento na síntese e, principalmente, na degradação proteica (devido à alta taxa de renovação celular durante o processo de cicatrização), juntamente com o estado de desidratação ocasionado, conseqüentemente também aumenta os níveis séricos de ureia. Uma vez que os níveis séricos de creatinina não sofreram alterações (o que indicaria prejuízo na função renal), os níveis séricos elevados de ureia provavelmente estão relacionados à elevada taxa de degradação proteica comumente presente no processo de cicatrização.

A determinação da concentração sérica de proteínas totais é de grande valia na avaliação das condições nutricionais do organismo e, conseqüentemente, no diagnóstico de perturbações metabólicas ou nutricionais, como obesidade, anorexia nervosa, desnutrição e síndrome da má absorção; além de doenças autoimunes, mieloma múltiplo, insuficiência renal e cardíaca, deficiência hepática, queimaduras graves, dentre outras. Os valores da concentração sérica de proteínas totais dos animais tratados com os compostos estudados, durante os diferentes períodos de tratamento, estão apresentados na Figura 42. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Todos os valores encontram-se dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre 6,5 g/dL e 9,0 g/dL) (GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), indicando que o tratamento com os compostos estudados não interferiu no estado nutricional dos animais.

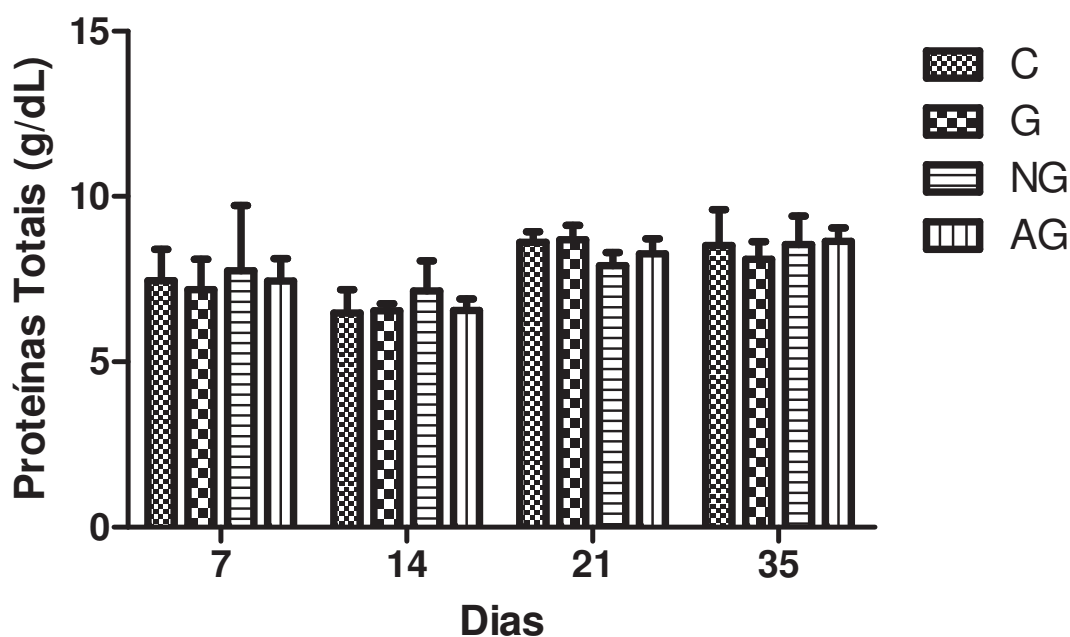


Figura 42 - Concentração sérica de proteínas totais dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

Transaminases são enzimas que catalisam especificamente reações de transaminação (transferência de um grupo amina, de um aminoácido, para um ácido α -cetoácido, formando um novo aminoácido e um novo ácido α -cetônico). As duas principais transaminases de interesse médico são aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Elevações nos níveis séricos de AST e ALT são indicativos de doenças hepáticas (hepatite crônica B ou C, doença hepática alcoólica, esteatose, hepatite autoimune, Doença de Wilson, dentre outras) e não hepáticas (doenças inatas do metabolismo muscular, doenças musculares adquiridas e exercícios vigorosos). A AST é encontrada, em ordem decrescente quanto à concentração, no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos; enquanto que a ALT é encontrada no fígado, tornando-a um marcador específico de dano hepático. A ALT encontra-se principalmente no citoplasma dos hepatócitos, enquanto que 80% da AST encontram-se na mitocôndria. Esta diferença auxilia no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas e é avaliada através da relação AST/ALT (Índice DeRitis). Em danos hepatocelulares leves, a forma predominante é citoplasmática; enquanto que em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial – elevando a relação AST/ALT.

Os valores da concentração sérica de AST e ALT dos animais tratados com os compostos estudados estão apresentados na Figura 43. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto aos valores de AST. Os valores praticamente dobraram com o aumento do tempo de tratamento (de cerca de 40 U/L, após 7 dias de tratamento, para cerca de 80 U/L, após 35 dias) – entretanto, permaneceram dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre 39,0 U/L e 92,0 U/L) (DANTAS *et al.*, 2006; GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012). Em relação aos valores de ALT, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; com exceção do grupo NG, tratado durante 7 dias, o qual apresentou valores estatisticamente inferiores ($p < 0.05$) quando comparados ao grupo controle (C). Entretanto, todos os valores obtidos encontram-se dentro dos valores de referência

descritos na literatura (entre 17,0 U/L e 60,0 U/L) (DANTAS *et al.*, 2006; GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012).

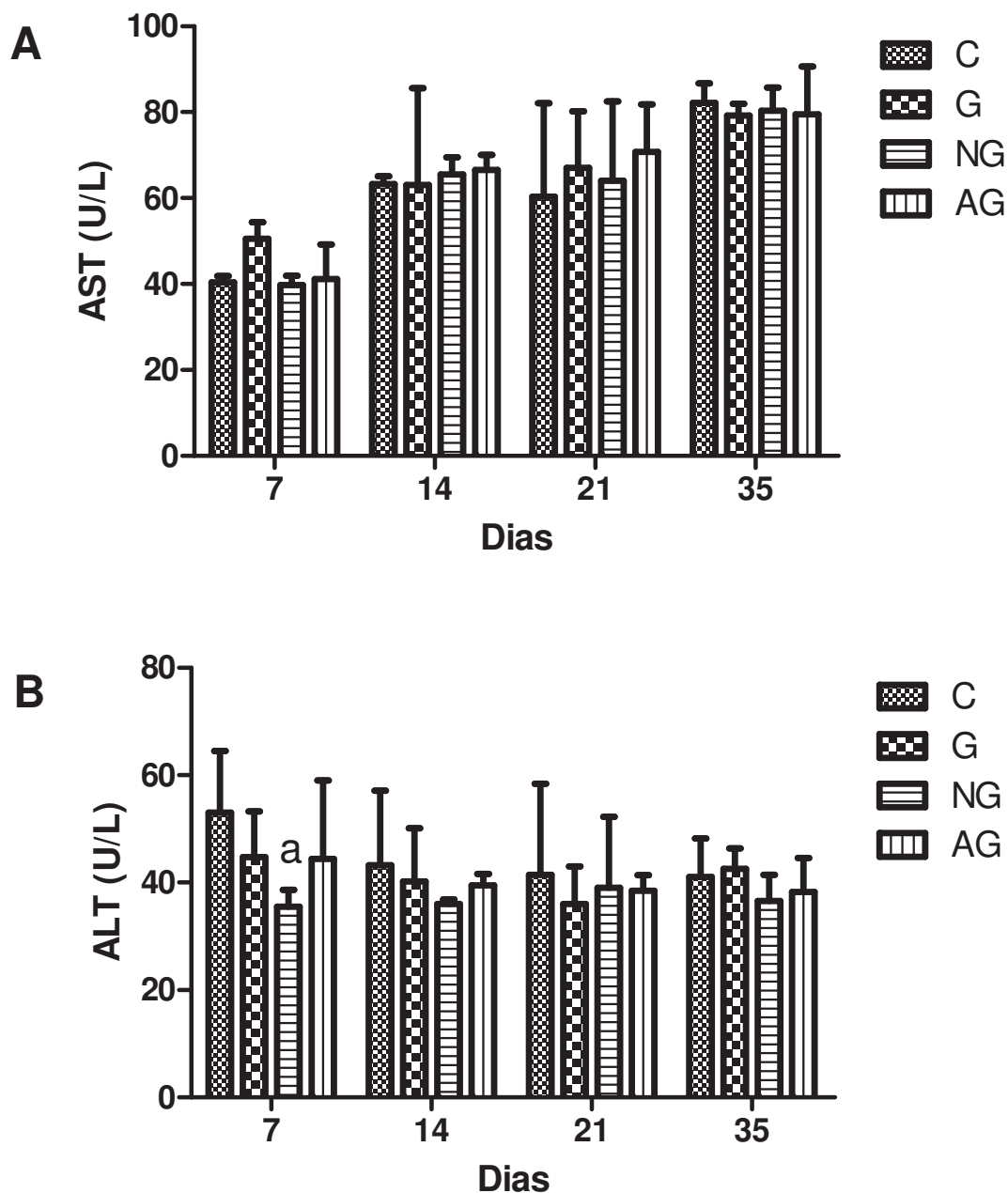


Figura 43 - Concentração sérica de aspartato aminotransferase (A) e alanina aminotransferase (B) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = $p < 0.05$ quando comparado a (C).

A relação AST/ALT foi maior que 1 para todos os grupos; com exceção dos grupos C e AG tratados durante 7 dias, nos quais a relação foi inferior a 1 – entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Este resultado indica que o dano hepático ocasionado foi mitocondrial – corroborando os resultados obtidos nos ensaios de redução do MTT realizados em hepatócitos, nos quais a capacidade de redução do MTT foi reduzida em mais da metade.

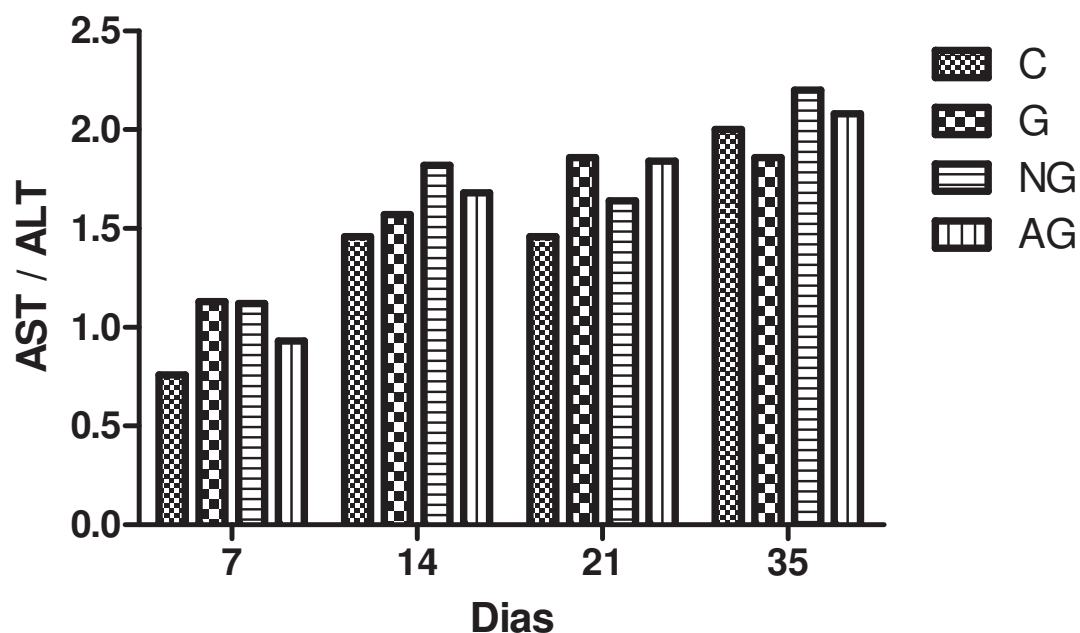


Figura 44 – Relação AST/ALT dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média dos valores obtidos nas análises de AST e ALT.

Fosfatase alcalina é uma família de enzimas responsáveis pela remoção dos grupos fosfato (desfosforilação) de nucleotídeos, proteínas e alcaloides. Por serem encontradas em maior quantidade no fígado e nos ossos, estas enzimas também são comumente utilizadas como biomarcadores para diagnóstico diferencial de hepatopatias e icterícias obstrutivas; além de auxiliar no diagnóstico de doenças ósseas e do

metabolismo mineral. Os valores da concentração sérica de fosfatase alcalina dos animais tratados com os compostos estudados, durante os diferentes períodos de tratamento, estão apresentados na Figura 45.

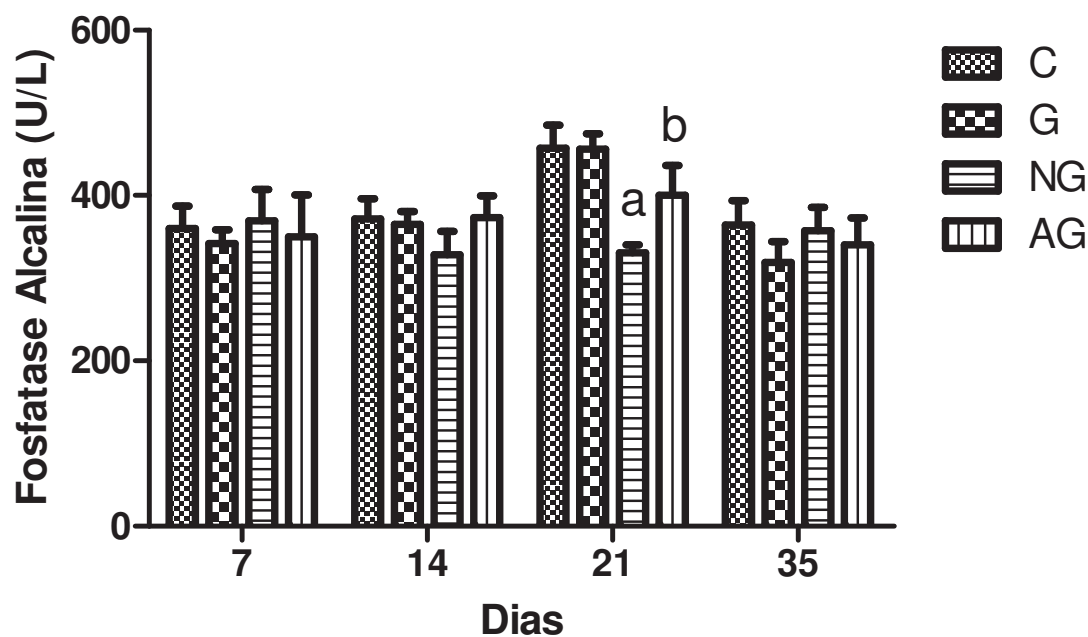


Figura 45 - Concentração sérica de fosfatase alcalina dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = $p < 0.001$ quando comparado a (C); b = $p < 0.05$ quando comparado a (C).

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; com exceção dos grupos NG e AG, tratados durante 21 dias, os quais apresentaram valores estatisticamente inferiores ($p < 0.001$ e $p < 0.05$, respectivamente) quando comparados ao grupo controle (C). Os valores estão acima dos valores de referência descritos na literatura (entre 39,0 U/L e 216,0 U/L) (DANTAS *et al.*, 2006; GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), sugerindo dano hepático e/ou ósseo aos animais. Entretanto, pacientes queimados podem desenvolver um quadro de icterícia

colestática – a queimadura provoca um desarranjo estrutural dos sinusóides hepáticos e esteatose (vacuolização dos hepatócitos), elevando os níveis das transaminases AST e ALT, da fosfatase alcalina (FA) e das bilirrubinas (ROCHA, 2009). O aumento dos níveis de FA é mais evidente na obstrução biliar, na qual o acúmulo de sais biliares solubiliza estas enzimas e a obstrução promove sua regurgitação entre as células hepáticas até o sangue. Nos casos em que há elevação dos níveis séricos de FA e ausência de sinais clínicos ou laboratoriais de doença hepatobiliar (como em nosso estudo, já que os níveis de AST e ALT apresentaram-se dentro dos valores de referência), a diferenciação entre as isoenzimas hepática, óssea e intestinal deve ser realizada para localizar a fonte da alteração. Ainda, queimaduras podem aumentar os níveis de bilirrubina e contribuir para o desenvolvimento de colecistite aguda acalculosa, geralmente ocasionada por estase e isquemia da vesícula biliar. Uma vez que o grupo controle também apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina elevados, os níveis observados nos demais grupos provavelmente não estão relacionados ao tratamento com os compostos estudados, mas sim à condição patológica (queimadura) na qual os animais se encontram.

A glicose é um monossacarídeo essencial às células, as quais o utilizam como fonte de energia e intermediário metabólico. O exame que avalia as concentrações séricas de glicose no organismo é de grande valia no diagnóstico de hipoglicemia e hiperglicemia, hiperatividade das glândulas tireoide, pituitária e/ou adrenal, tumores secretores de insulina e demais condições que interferem com a absorção de glicose. Os valores da concentração sérica de glicose dos animais tratados com os compostos estudados, durante os diferentes períodos de tratamento, estão apresentados na Figura 46. Os valores dos grupos G, NG e AG, tratados durante 7 dias, foram significativamente maiores ($p < 0.001$) que os valores do grupo controle (C). Em relação ao tratamento de 14 dias, o grupo NG apresentou valores estatisticamente inferiores ($p < 0.01$) quando comparados ao controle (C); e em relação ao tratamento de 21 dias, os grupos G e AG apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0.05$) quando comparados ao grupo controle (C). Estes resultados sugerem que o tratamento

com os compostos estudados foram responsáveis pelo aumento dos níveis glicêmicos destes animais, possivelmente desencadeando um quadro de diabetes nos mesmos. Entretanto, os valores do grupo controle também se apresentaram elevados, acima dos valores de referência descritos na literatura (entre 85,0 mg/dL e 135,0 mg/dL) (DANTAS *et al.*, 2006; GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012), indicando que esta elevação pode ser decorrente do estresse causado aos animais e consequente elevação nos níveis de cortisol; o qual é hiperglicemiante, agindo como antagonista da insulina e aumentando os índices de glicemia e a produção de glicogênio pelo fígado. Além disso, maiores níveis de glicemia podem estar associados à esteatose hepática (gordura no fígado), uma das patologias que podem ocorrer como consequência de queimaduras – como discutido anteriormente.

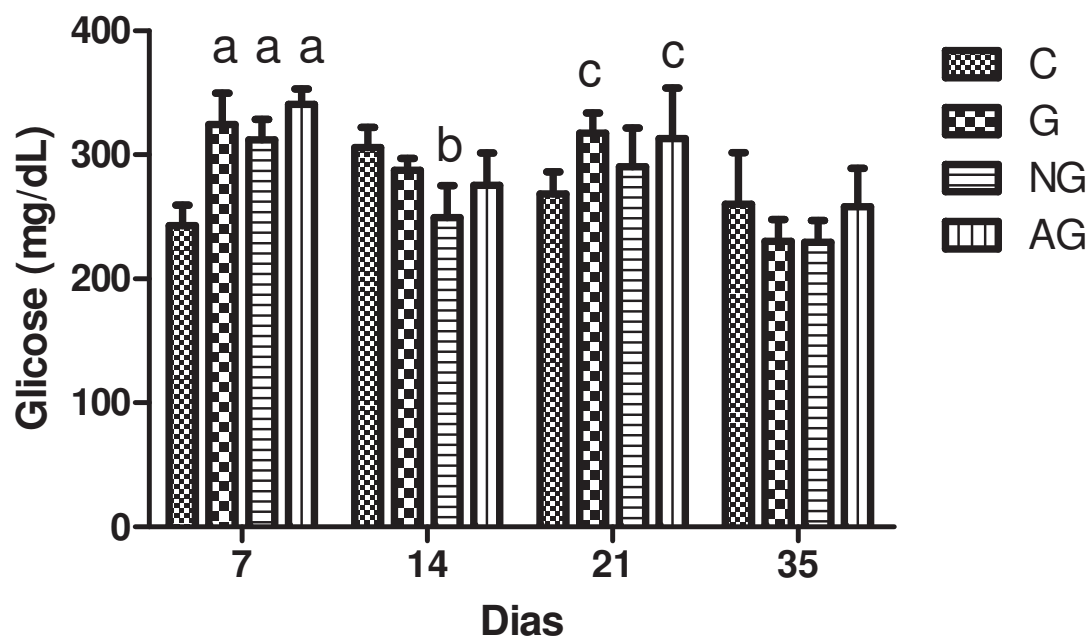


Figura 46 - Concentração sérica de glicose dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = $p < 0.001$ quando comparado a (C); b = $p < 0.01$ quando comparado a (C); c = $p < 0.05$ quando comparado a (C).

4.4.2 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

O hemograma, exame que avalia as células sanguíneas, é um dos principais exames realizados para diagnóstico de doenças ou controle de sua evolução. Este exame é constituído basicamente pela contagem absoluta de leucócitos (glóbulos brancos) e de hemácias (glóbulos vermelhos), concentração de hemoglobina (Hb), percentual de hemácias no volume total de sangue (hematócrito) e contagem absoluta de plaquetas; além de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Através deste exame, é possível ainda fazer a diferenciação dos leucócitos em neutrófilos, linfócitos e monócitos, eosinófilos e basófilos. Os resultados das análises dos parâmetros hematológicos dos animais tratados com os compostos estudados, durante os diferentes períodos de tratamento, estão apresentados nas Figuras 47 a 51.

Leucócitos são um grupo de células diferenciadas a partir de células-tronco pluripotentes oriundas da medula óssea e que fazem parte do sistema imune do organismo, combatendo e eliminando microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo, por meio de sua captura ou da produção de anticorpos. A diminuição da quantidade de leucócitos está relacionada a um aumento na susceptibilidade a infecções; enquanto que o aumento da quantidade está relacionado a uma resposta a infecções já instaladas, substâncias estranhas ou estresse. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; com exceção do grupo NG tratado durante 7 dias, o qual apresentou valores significativamente maiores que o grupo controle (C). Os valores da contagem absoluta de leucócitos estão dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre $4,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $12,0 \times 10^3/\mu\text{L}$) (DANTAS *et al.*, 2006; GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), sugerindo que a queimadura induzida nos animais não foi grave a ponto de causar infecção sistêmica ou que os compostos estudados realmente possuem uma elevada atividade antimicrobiana e auxiliaram o organismo no combate à infecção.

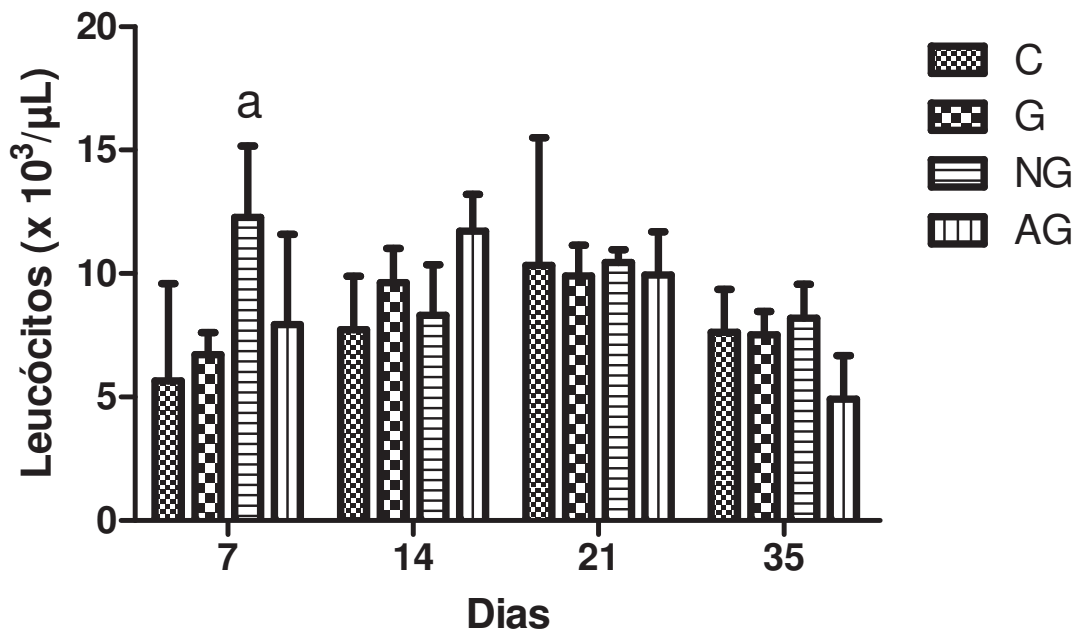


Figura 47 – Contagem absoluta de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = $p < 0.001$ quando comparado a (C).

As hemácias são as unidades morfológicas da série sanguínea vermelha, constituídas basicamente por globulina e hemoglobina, e responsáveis pelo transporte de oxigênio (principalmente) e gás carbônico aos tecidos. Alterações na quantidade de hemácias presentes no organismo estão relacionadas a doenças como anemias e policitemias. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os valores estão dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre $5,4 \times 10^6/\mu\text{L}$ e $8,5 \times 10^6/\mu\text{L}$) (GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), sugerindo que o tratamento com os compostos estudados não alterou a quantidade de hemácias e, conseqüentemente, não ocasionou doenças relacionadas.

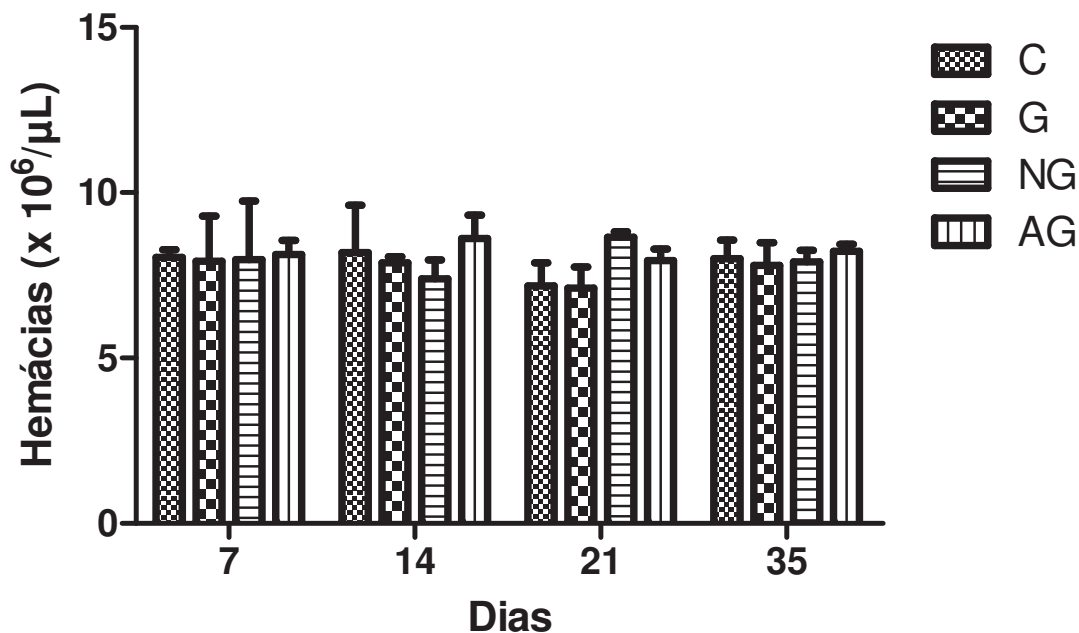


Figura 48 - Contagem absoluta de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

A hemoglobina é uma proteína presente nos eritrócitos (hemácias), constituindo aproximadamente 35% de seu peso. Presente no sangue, esta proteína é responsável por transportar o oxigênio, levando-o dos pulmões aos tecidos. Além do transporte de oxigênio, a hemoglobina participa do transporte de nutrientes a todas as células do corpo; processo no qual o sangue leva os nutrientes e recolhe as substâncias secretadas pelas células – conduzindo-as, posteriormente, para fora do organismo. Para se combinarem com o oxigênio, os eritrócitos precisam contê-lo em quantidade suficiente, e isto depende dos níveis de ferro presentes no organismo. A presença de hemoglobina abaixo dos valores de referência (por exemplo, níveis abaixo de 12 g/dL) indica anemia. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os valores estão dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre 11,5 g/dL e 16,0 g/dL)

(GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), sugerindo que o tratamento com os compostos estudados não alterou a quantidade de hemoglobina, conseqüentemente não ocasionando anemia.

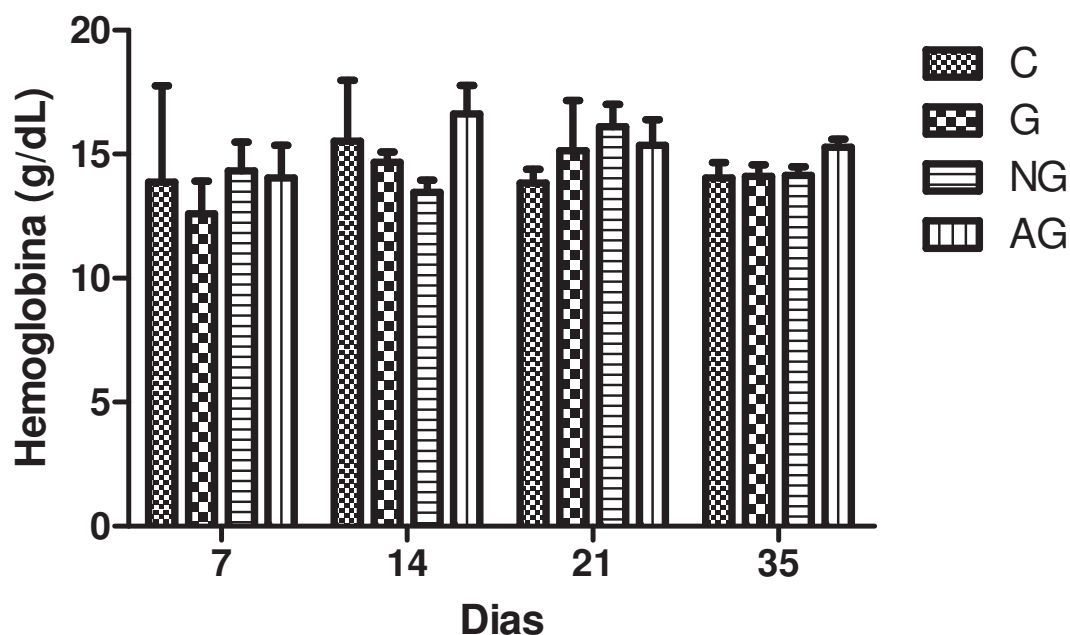


Figura 49 - Contagem absoluta de hemoglobina ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = $p < 0.001$ quando comparado a (C).

O hematócrito avalia a porcentagem de hemácias no volume total de sangue, auxiliando no diagnóstico de anemias, perda sanguínea, hemólise, leucemia, hipertireoidismo, desidratação, policitemias, choque, dentre outros. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os valores apresentaram-se dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre 37,0% e 49,0%) (GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES & LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), sugerindo que o tratamento

com os compostos estudados não alterou este parâmetro e, conseqüentemente, não ocasionou doenças relacionadas.

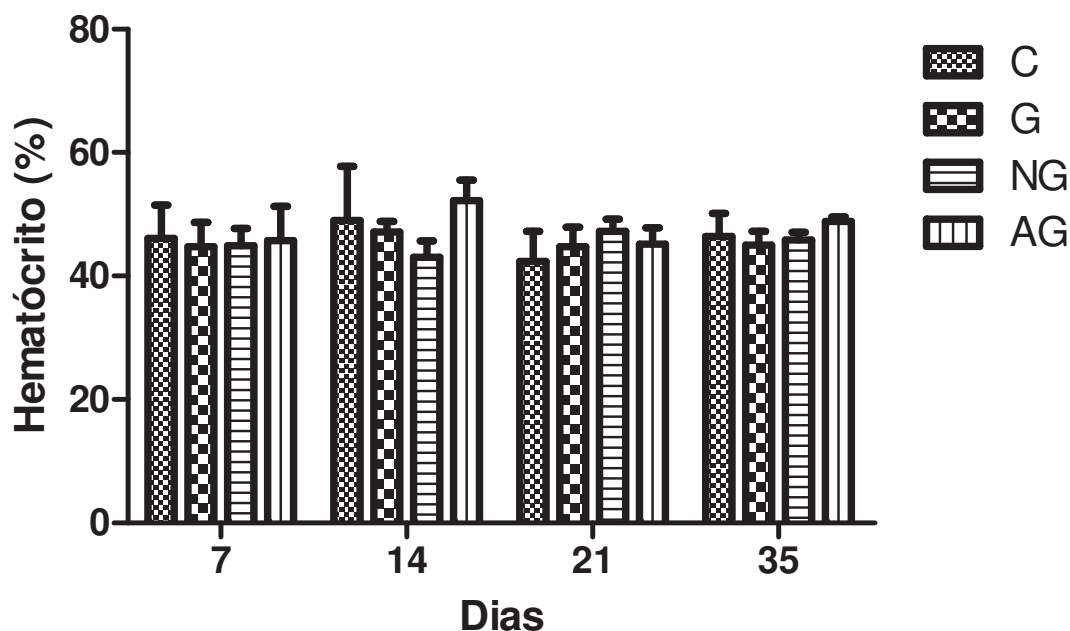


Figura 50 - Hematócrito (%) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

As plaquetas são fragmentos celulares formados a partir da fragmentação do citoplasma de glóbulos brancos gigantes, denominados megacariócitos. De modo geral, a diminuição na quantidade de plaquetas pode ocasionar sangramentos, enquanto que o aumento pode ocasionar trombose. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; com exceção do grupo AG tratado durante 14 dias, o qual apresentou valores significativamente inferiores ($p < 0.01$) aos valores do grupo controle (C). Entretanto, todos os valores estão dentro dos valores de referência descritos na literatura (entre $450,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $885,0 \times 10^3/\mu\text{L}$) (GIKNIS & CLIFFORD, 2008; EBISUI, FONTES &

LAPCHIK, 2009; MELO *et al.*, 2012), sugerindo que o tratamento com os compostos estudados não alterou este parâmetro e, conseqüentemente, não ocasionou doenças relacionadas.

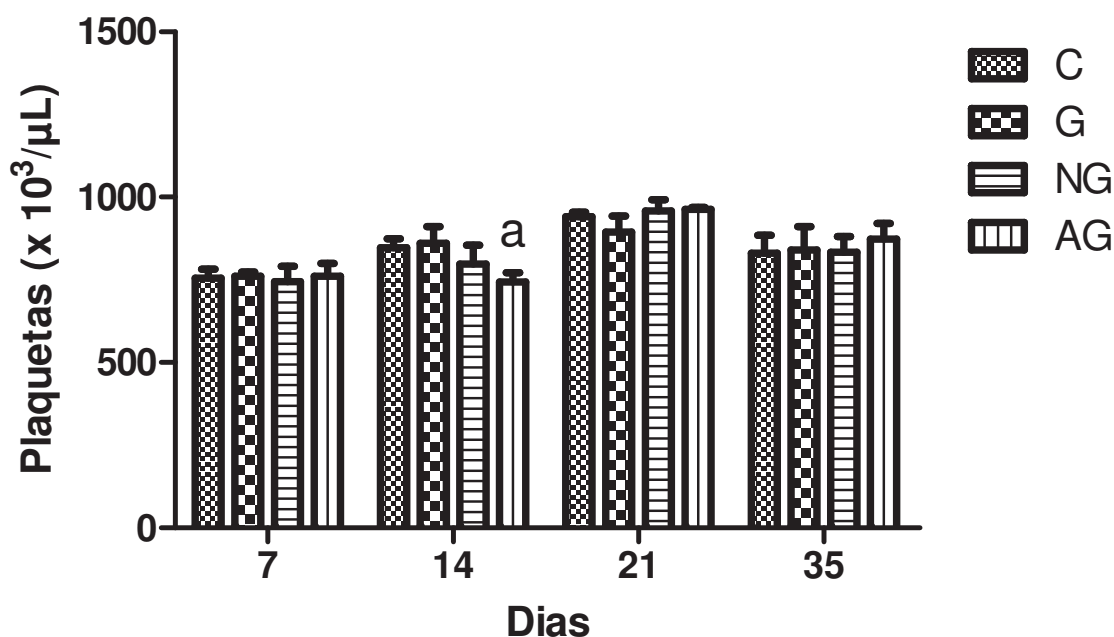


Figura 51 - Contagem absoluta de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5).

De modo geral, os compostos estudados não provocaram alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais. Os valores de ureia apresentaram-se um pouco elevados, mas provavelmente estavam associados à elevada taxa de degradação proteica comum no processo de cicatrização (uma vez que os níveis séricos de creatinina não sofreram alterações, o que indicaria prejuízo na função renal). A relação AST/ALT obtida foi maior do que 1, indicando dano hepático a nível mitocondrial – o que pôde ser confirmado através da diminuição da capacidade de redução do MTT pelos hepatócitos nos ensaios de citotoxicidade. Os níveis séricos de

fosfatase alcalina e glicose também se apresentaram mais elevados que os valores de referência, mas provavelmente indicam uma consequência das queimaduras e do estresse sofrido pelos animais, e não do tratamento com os compostos estudados (uma vez que os níveis do grupo controle também se apresentaram elevados). Estes resultados indicam que o GSNO (livre ou encapsulado em nanopartículas de PCL recobertas por quitosana) e as nanopartículas de prata podem ser utilizados em aplicações biomédicas, proporcionando poucos efeitos a nível sistêmico.

4.4.3 Biodistribuição de Prata em Sangue e Órgãos

Uma vez que AgNPs não são biodegradáveis e exibiram efeitos tóxicos *in vitro*, tornou-se essencial a avaliação da penetração destas nanopartículas e seu possível acúmulo no organismo. A Figura 52 mostra a biodistribuição de prata em sangue, pele, fígado, rins, pulmão e baço dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados com AgNPs durante 7, 14, 21 e 35 dias. Nos animais do grupo controle, as concentrações não foram expressivas (dados não mostrados). Através dos resultados obtidos, foi possível observar que as AgNPs penetraram de forma sistêmica e se acumularam, principalmente, no fígado e no baço. Em queimaduras, o muco produzido no leito da ferida (constituído por glicoproteínas) possui carga parcial negativa – o que favorece a adesão/permeação de nanopartículas com carga superficial positiva (como nanopartículas recobertas por quitosana) e dificulta a permeação de nanopartículas com carga superficial negativa, como as AgNPs. Entretanto, como discutido anteriormente, AgNPs produzidas por método biológico utilizando-se o fungo *Fusarium oxysporum* possuem uma capa proteica em torno de sua superfície. Esta capa proteica atua como um mecanismo de opsonização, facilitando o reconhecimento das nanopartículas por neutrófilos e macrófagos presentes no leito da ferida e sua consequente fagocitose pelo sistema retículo endotelial (SRE). Fígado, baço e pulmão contêm mais de 95% da quantidade total de macrófagos do SRE, consequentemente são os órgãos que mais captam e fagocitam corpos estranhos.

A maior permeação de AgNPs em pele danificada, quando comparada à pele intacta, também foi demonstrada *in vitro* – no estudo de Larese *et al.* (2009), as nanopartículas penetraram a pele intacta com um valor médio de 0,46 ng/cm² após 24 horas da aplicação; enquanto que na pele lesionada, este valor foi cinco vezes maior (2,32 ng/cm²). Outros estudos da literatura demonstraram o acúmulo de AgNPs administradas por via oral e intravenosa; bem como de nanopartículas de ouro, TiO₂, pontos quânticos (*quantum dots*) e sílica (WANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; DE JONG *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2008; LANKVELD *et al.*, 2010; LOESCHNER *et al.*, 2011).

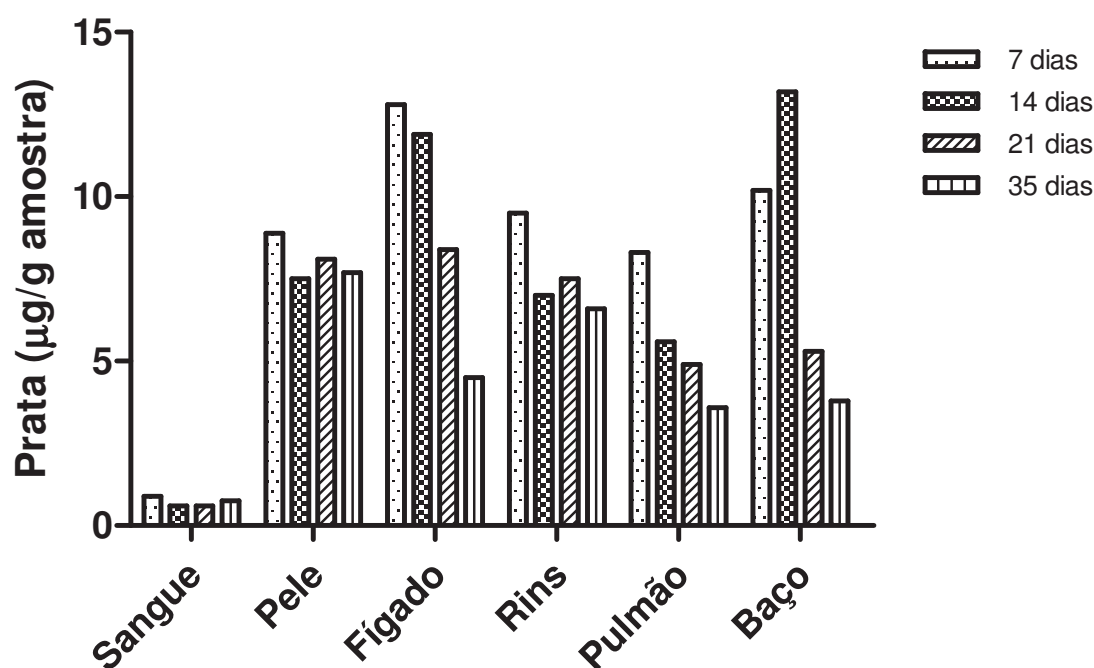


Figura 52 - Concentração de prata, obtida através de ICP-OES, no sangue e em diferentes órgãos dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com AgNPs. A concentração de prata do grupo controle não foi expressiva (dados não mostrados).

Apesar da considerável presença de AgNPs nos órgãos avaliados e dos efeitos tóxicos observados nos ensaios de citotoxicidade com hepatócitos, não foram observados efeitos tóxicos expressivos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, conforme discutido anteriormente (itens 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente). Em virtude do

grande potencial destas nanopartículas na cicatrização de feridas, mais estudos sobre sua toxicidade são necessários e relevantes.

4.5 Avaliação do Potencial de Cicatrização de GSNO Livre e das Nanopartículas nos Animais Induzidos à Queimadura

4.5.1 Redução do Diâmetro da Lesão

O perfil de redução do diâmetro das lesões provocadas pela queimadura, avaliado macroscopicamente durante o tratamento com os compostos estudados, está apresentado na Figura 53. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que o grupo controle apresentou uma redução significativa no diâmetro das lesões após 21 dias de tratamento; enquanto que nos grupos G e NG, houve uma redução estatisticamente significativa após 14 dias. O grupo AG apresentou uma pequena redução no diâmetro das lesões após 7 dias, mantendo-se constante por mais 7 dias. Após este período, houve uma redução brusca e significativa nos diâmetros. Apesar de não ter demonstrado um perfil de redução gradativo (como observado nos grupos G e NG), o diâmetro das lesões do grupo AG, após 21 e 28 dias de tratamento, apresentou-se menor que os demais grupos – sugerindo uma melhor eficácia das AgNPs em relação aos outros compostos. De modo geral, o tratamento com os compostos estudados auxiliou no processo de cicatrização das lesões provocadas pela queimadura, reduzindo o diâmetro das mesmas mais rapidamente, quando comparado ao grupo controle.

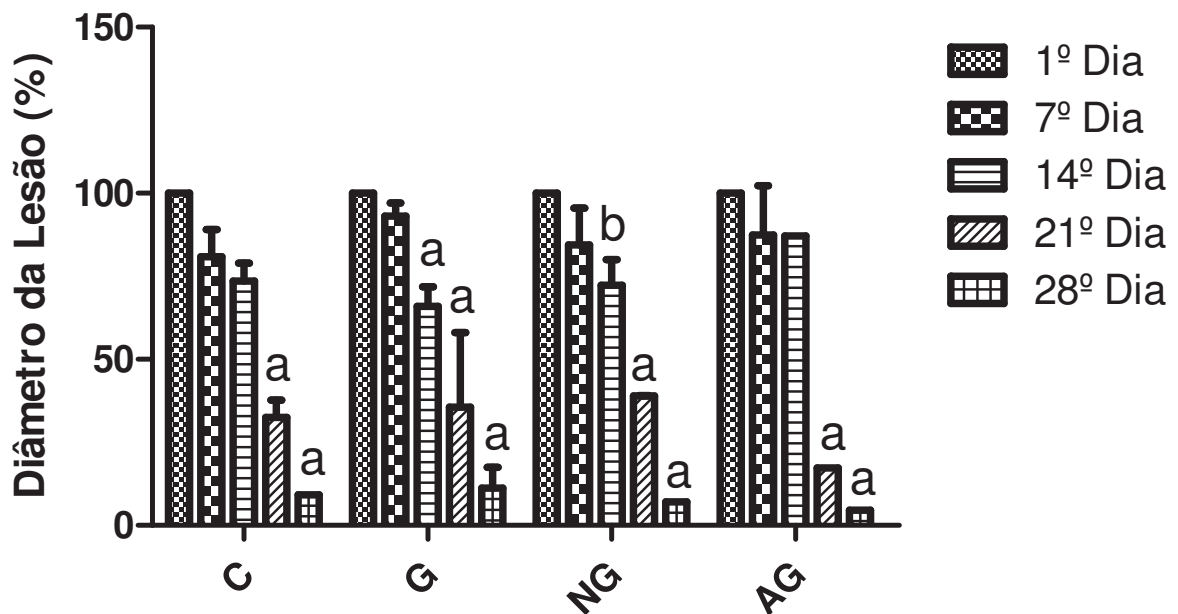


Figura 53 – Diâmetro das lesões (%) dos animais submetidos à queimadura térmica e posteriormente tratados durante 7, 14, 21 e 35 dias com os compostos estudados. Legenda: (C) Grupo controle, tratado com gel puro; (G) Grupo tratado com gel contendo GSNO livre; (NG) Grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS; (AG) Grupo tratado com gel contendo AgNPs. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5). a = $p < 0.001$ quando comparado ao 1º dia; b = $p < 0.01$ quando comparado ao 1º dia; c = $p < 0.05$ quando comparado ao 1º dia.

4.5.2 Avaliação do Processo de Cicatrização

O processo de cicatrização foi avaliado histologicamente após o sacrifício dos animais. Os cortes histológicos obtidos da pele dorsal dos animais, realizados após 7, 14 e 21 dias de tratamento com gel puro (controle) e gel contendo GSNO livre, estão apresentados na Figura 54. A partir dos cortes histológicos obtidos, foi possível observar que 7 dias após tratamento com gel contendo GSNO livre, a epiderme apresentou-se destruída e a derme apresentou-se constituída por tecido conjuntivo frouxo, com poucas fibras de colágeno e baixa celularidade local. Após 14 dias de tratamento, foi possível observar mudança do tecido conjuntivo de frouxo para denso, caracterizado por grande quantidade de fibras espessas de colágeno orientadas em diferentes direções, aumento da celularidade local (grande quantidade de fibroblastos)

e início da reepitelização da epiderme. Após 21 dias de tratamento, a epiderme apresentou-se regenerada e a derme apresentou grande quantidade de miofibroblastos (células contráteis indicativas de cicatrização) – enquanto que no grupo controle, foram observadas as mesmas características do início do tratamento (sugerindo que não houve cicatrização).

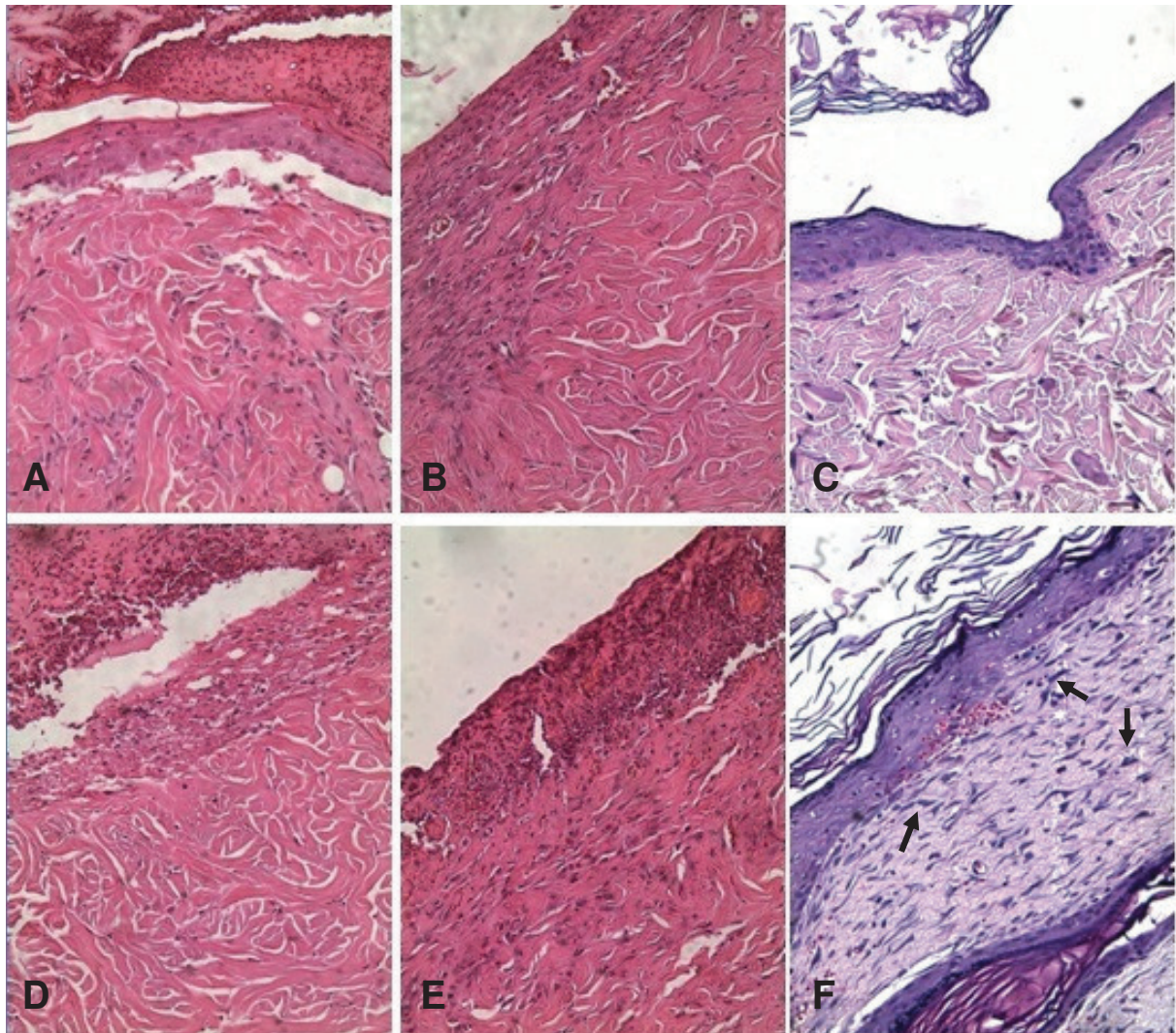


Figura 54 – Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dorsal dos animais após tratamento com gel puro (controle) e gel contendo GSNO livre. Legenda: A, B e C – Grupo controle após 7, 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente. D, E e F – Grupo tratado com GSNO livre após 7, 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente. As setas indicam miofibroblastos (células contráteis indicativas de cicatrização).

Os cortes histológicos obtidos da pele dorsal dos animais controle e dos animais tratados com gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS estão apresentados na Figura 55. A partir dos cortes histológicos obtidos, foi possível observar que não houve mudanças significativas na derme após 14 dias de tratamento, quando comparado à derme observada após 7 dias. A derme apresentou-se constituída por tecido conjuntivo bastante denso, com grande quantidade de fibras espessas e de células no local. Após 21 dias de tratamento, a epiderme apresentou-se regenerada e a derme apresentou grande quantidade de miofibroblastos e novos vasos sanguíneos, sugerindo o término das fases do processo de cicatrização – enquanto que no grupo controle, foram observadas as mesmas características do início do tratamento (sugerindo que não houve cicatrização). O tratamento com as PCL/CS contendo GSNO reduziu o tempo necessário para a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, revertendo o processo inflamatório mais rapidamente.

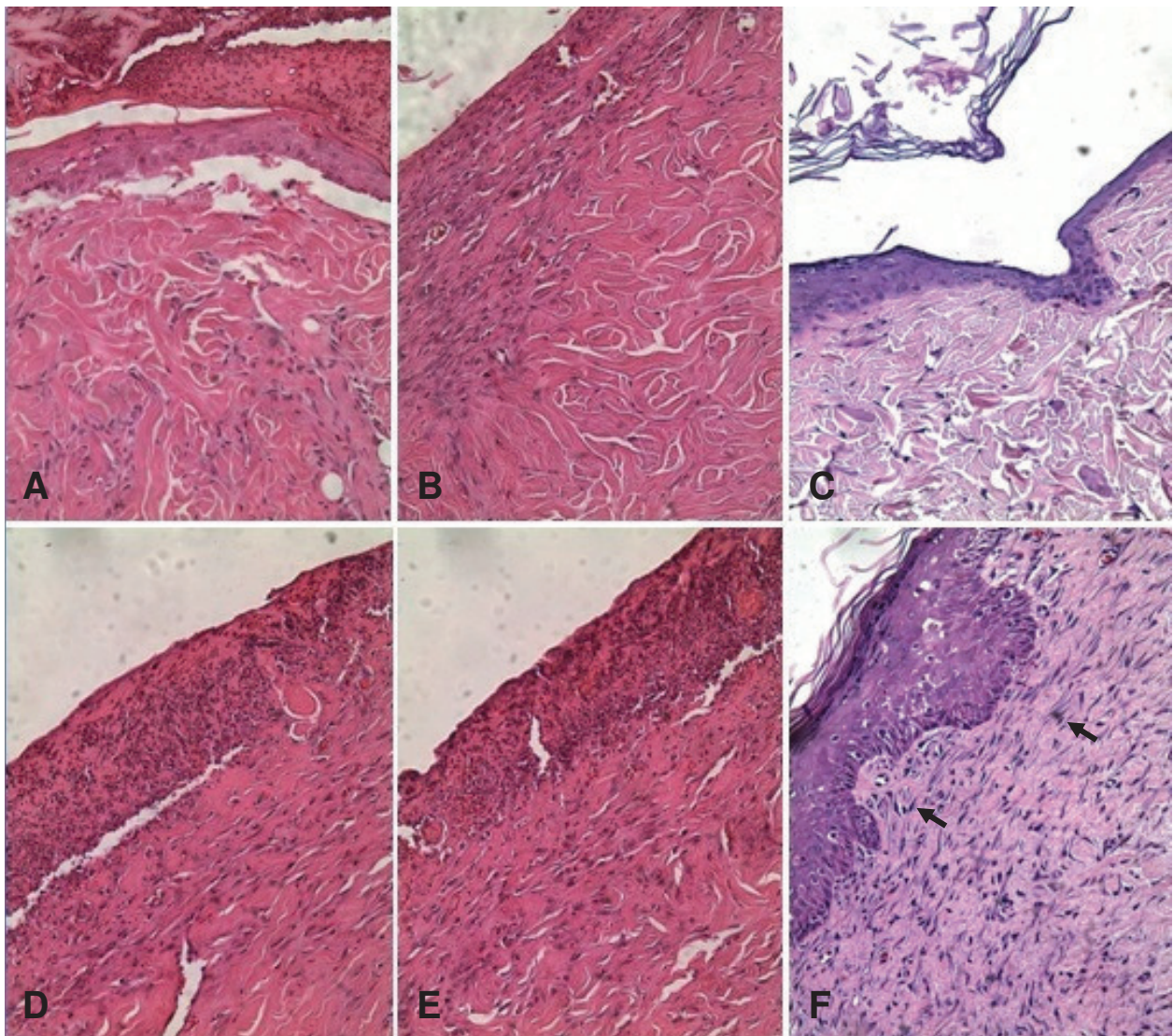


Figura 55 – Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dorsal dos animais após tratamento com gel puro (controle) e gel contendo GSNO encapsulado em PCL/CS. Legenda: A, B e C – Grupo controle após 7, 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente. D, E e F – Grupo tratado com GSNO encapsulado em PCL/CS após 7, 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente. As setas indicam miofibroblastos (células contráteis indicativas de cicatrização).

Os cortes histológicos obtidos da pele dorsal dos animais controle e dos animais tratados com gel contendo AgNPs estão apresentados na Figura 105. Os resultados foram semelhantes aos observados nos cortes histológicos do grupo tratado com gel contendo GSNO encapsulado – não houve mudanças significativas na derme após 14 dias de tratamento, quando comparado à derme observada após 7 dias, e

houve grandes mudanças após 21 dias de tratamento. A epiderme apresentou-se regenerada e a derme apresentou grande quantidade de miofibroblastos, sugerindo o término do processo de cicatrização – enquanto que no grupo controle, foram observadas as mesmas características do início do tratamento (sugerindo que não houve cicatrização). O tratamento com AgNPs reduziu o tempo necessário para a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, revertendo o processo inflamatório mais rapidamente.

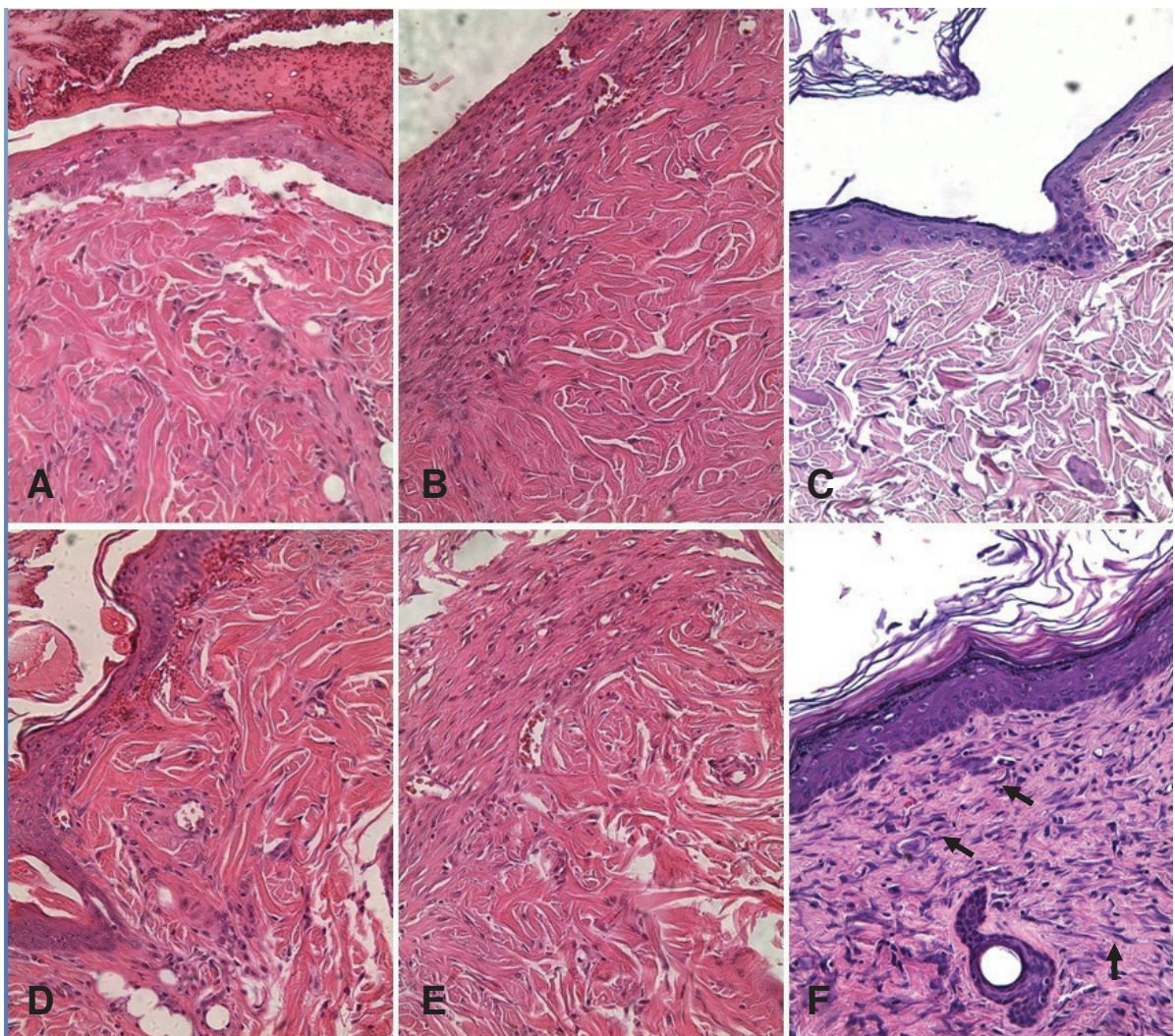


Figura 56 – Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dorsal dos animais após tratamento com gel puro (controle) e gel contendo AgNPs. A, B e C – Grupo controle após 7, 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente. D, E e F – Grupo tratado com GSNO encapsulado em PCL/CS após 7, 14 e 21 dias de tratamento, respectivamente. As setas indicam miofibroblastos (células contráteis indicativas de cicatrização).

Conclusões

5. CONCLUSÕES

As AG/CS não foram adequadas para a administração de GSNO, por apresentarem baixa eficiência de encapsulação e por não se apresentarem como um sistema de liberação sustentada. As PCL/CS apresentaram eficiência de encapsulação de cerca de 70% e se mostraram adequadas para utilização como sistema de liberação sustentada de fármacos hidrofílicos. As AgNPs foram produzidas utilizando-se um método economicamente viável e adequado para aplicações biomédicas, e mostraram-se estáveis por um longo período de tempo. De modo geral, o GSNO (livre ou encapsulado) e as nanopartículas poliméricas foram pouco tóxicos *in vitro* e *in vivo*. As AgNPs apresentaram-se citotóxicas em concentrações relativamente baixas para os três tipos celulares avaliados, o que não inviabilizaria sua utilização em aplicações biomédicas visto que foram pouco tóxicas nos estudos *in vivo* (não interferindo nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais). O tratamento com os compostos estudados reduziu o tempo necessário para a diferenciação de fibroblastos em células hiperativas (miofibroblastos), envolvidas na geração de força contrátil na ferida, revertendo o processo inflamatório mais rapidamente – possibilitando sua utilização em aplicações biomédicas visando ao tratamento de lesões provocadas por queimadura.

Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

- ❖ Aumentar o rendimento da síntese de GSNO e avaliar a decomposição do composto por um período maior de tempo;
- ❖ Aumentar a eficiência de encapsulação do GSNO nas nanopartículas de alginato-quitosana (AG/CS) e retardar a liberação do composto a partir das nanopartículas, tornando-as um sistema de liberação sustentada;
- ❖ Avaliar a permeação do GSNO através da pele, utilizando-se células de Franz;
- ❖ Avaliar os efeitos citotóxicos das AgNPs, em diferentes concentrações e tipos celulares, ampliando o conhecimento sobre a citotoxicidade destas nanopartículas;
- ❖ Ampliar a análise dos efeitos do GSNO e das nanopartículas sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, e fazer o diagnóstico diferencial de hepatopatias utilizando outros biomarcadores;
- ❖ Ampliar os estudos sobre a biotransformação das AgNPs, bem como sobre o acúmulo das nanopartículas em diferentes órgãos – uma vez que as nanopartículas não são biodegradáveis
- ❖ Associar o GSNO às nanopartículas de prata e avaliar se esta associação potencializa o efeito cicatrizante dos compostos.

Referências

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. **Colloids and Surfaces B**, 28: 313-318, 2003.

AMADEU, T. P.; COSTA, A. M. A. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. **Journal of Cutaneous Pathology**, 33: 465-473, 2006.

AMADEU, T. P. *et al.* S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 21: 629-637, 2007.

_____. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. **Journal of Surgical Research**, 149: 84-93, 2008.

AMERICAN BURN ASSOCIATION. **2011 National Burn Repository – Report of data from 2001-2010**, 2011.

ATHER, S.; CHAN, D. S. The biology of wound healing. **European Journal of Hospital Pharmacy Practice (EJHP Practice)**, v. 13, p. 53-54-1, 2007.

ATIYEH, B. S.; HAYEK, S. N.; GUNN, S. W. New technologies for burn wound closure and healing - Review of the literature. **Burns**, 31: 944-956, 2005.

ATIYEH, B. S. *et al.* Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, 33: 139-148, 2007.

BASAVARAJA, S. *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. **Materials Research Bulletin**, 43: 1164–1170, 2008.

BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 57: 19–34, 2004.

BILENSOY, E. *et al.* Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. **International Journal of Pharmaceutics**, 371: 170-176, 2009.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Methods in Cell Science**, v. 09, n. 01, p. 7-9, 1985.

BORGES, O. *et al.* Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, 299: 155-166, 2005.

BRASIL. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde. **Internação por queimadura é grave em quase metade das ocorrências**. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/ses/noticias/2010/junho/internacao-por-queimadura-e-grave-em-quase-metade-das-ocorrencias>>. Acesso em: 15 nov 2011.

_____. **SP tem 9 internações diárias por queimaduras**. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/ses/noticias/2011/junho/sp-tem-9-internacoes-diarias-por-queimaduras>>. Acesso em: 15 nov 2011.

BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 01, p. 1-7, 1998.

BURGAUD, J. L.; RIFFAUD, J. P.; DEL SOLDATO, P. Nitric-oxide releasing molecules: a new class of drugs with several major indications. **Current Pharmaceutical Design**, 8: 201-213, 2002.

BYUN, Y. *et al.* Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **LWT – Food Science and Technology**, 44: 24-28, 2011a.

_____. α -Tocopherol-loaded polycaprolactone (PCL) nanoparticles as a heat-activated oxygen scavenger. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59: 1428-1431, 2011b.

CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide**, 10: 179-193, 2004.

CAO, H.; LIU, T.; CHEW, S. Y. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 61: 1055-1064, 2009.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11. p. 580-588, 2010.

CHAMAKURA, K. *et al.* Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 84: 88-96, 2011.

CHUENJITKUNTAWORN, B. *et al.* Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* biological responses of human primary bone cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 241-251, 2010.

CHUNG, Y.; CHEN, I.; CHEN, C. The surface modification of silver nanoparticles by phosphoryl disulfides for improved biocompatibility and intracellular uptake. **Biomaterials**, 29: 1807-1816, 2008.

CHURCH, D. *et al.* Burn wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 403-434, 2006.

CINGI, M. R. *et al.* Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach. **Toxicology In Vitro**, 1991.

CIRPANLI, Y. *et al.* Comparative evaluation of *in vitro* parameters of tamoxifen citrate loaded poly(lactide-co-glycolide), poly(ϵ -caprolactone) and chitosan nanoparticles. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 12, p. 867-870, 2010.

CORRÊA, D. H. A. *et al.* Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 510, n. 1-2, p. 17-24, 2005.

DAI, T. *et al.* Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 02, p. 393-400, 2009.

_____. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 09, n. 07, p. 857-879, 2011.

DAMM, C.; MÜNSTEDT, H. Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites. **Applied Physics A**, 91: 479-486, 2008.

DANTAS, J. A. *et al.* Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.**, v. 28, n. 02, p. 165-170, 2006.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6: 153-160, 2010.

DE OLIVEIRA, M. G. *et al.* Thermal stability of primary S-Nitrosothiols: roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. **Journal of Physical Chemistry – A**, v. 106, n. 38, p. 8963-8970, 2002.

DE SOUZA, G. F. P. *et al.* Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxide**, 15: 209-216, 2006.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, 89(2): 271-277, 1986.

DeSANTI, L. Pathophysiology and current management of burn injury. **Advances in Skin & Wound Care**, 18: 323-332; quiz 333-334, 2005.

DOUGLAS, K. L. *et al.* Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 3, p. 354-361, 2006.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, p. 1-7, 2005.

_____. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 203-208, 2007.

EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, 19: 777-783, 2010.

FENG, Q. L. *et al.* A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **John Wiley & Sons, Inc.**, 662-668, 2000.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science Technology Today (PSTT)**, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FONG, J.; WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 01, n. 04, p. 441-449, 2006.

FURNO, F. *et al.* Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54: 1019-1024, 2004.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **Journal of Pathology**, 200: 500-503, 2003.

GARDNER, P. J.; KNITTEL-KEREN, D.; GOMEZ, M. The posttraumatic stress disorder checklist as a screening measure for posttraumatic stress disorder in rehabilitation after burn injuries. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 93, p. 623-628, 2012.

GAZORI, T. *et al.* Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. **Carbohydrate Polymers**, 77: 599-606, 2009.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. *et al.* Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, 114: 1-14, 2006.

GRUNWALD, T. B.; GARNER, W. L. Acute burns. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 121, n. 5, p. 311e-319e, 2008.

GUGUEN-GUILLOUZO, C.; GUILLOUZO, A. Methods for preparation of adult and fetal hepatocytes. In: GUILLOUZO, A.; GUGUEN-GUILLOUZO, C., editors. **Isolated and Cultured Hepatocytes**. Paris: Les Editions INSERM and John Libbey Eurotext, 1986, p. 1-12.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 15, p. 314-321, 2008.

HART, T. W. Some observations concerning the S-Nitroso and S-Phenylsulphonyl derivatives of L-Cysteine and Glutathione. **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 16, p. 2013-2016, 1985.

HERMANS, M. H. E. A general overview of burn care. **International Wound Journal**, v. 2, n. 3, p. 206-220, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: _____. **Histologia Básica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 359-370.

KASTEN, K. R. *et al.* Update on the critical care management of severe burns. **Journal of Intensive Care Medicine**, 26(4): 223-236, 2011.

LEBRE, F. *et al.* Chitosan-based nanoparticles as a hepatitis B antigen delivery system. In: DÜZGÜNES, N. (ed.). **Methods in Enzymology** – Volume 509, Nanomedicine: infectious diseases, immunotherapy, diagnostics, antifibrotics, toxicology and gene medicine. Academic Press, 2012. cap. 7, p. 127-142.

LIU, J. *et al.* Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, 90: 16-22, 2012.

MANDELBAUM, S. H. *et al.* Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 78(5): 525-542, 2003.

MARCATO, P. D. *et al.* Glutathione and S-Nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: cytotoxicity. **Journal of Physics: Conference Series**, 304 012045, 2011.

MAZZARINO, L. *et al.* Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, 370: 58-66, 2012.

MELIONE, L. P. R.; MELLO-JORGE, M. H. P. Gastos do Sistema Único de Saúde com internações por causas externas em São José dos Campos, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 24(8): 1814-1824, 2008.

MENG, F. T. *et al.* W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 91, n. 3, p. 407-416, 2003.

MUKHERJEE, P. *et al.* Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. **ChemBioChem**, n. 5, p. 461-463, 2002.

RODRIGUEZ, J. A.; HAUN, M. Cytotoxicity of *trans*-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. **Planta Med**, 65(6): 522-526, 1999.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SASTRY, M. *et al.* Microbial Nanoparticle Production. In: NIEMEYER, C. M.; MIRKIN, C. A. (Ed.). **Nanobiotechnology** – Concepts, applications and perspectives. Weinheim: WILEY-VCH, 2003. cap. 9, p. 126-135.

SEABRA, A. B. *et al.* S-Nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. **Nitric Oxide**, v. 11, n. 3, p. 263-272, 2004.

SHISHIDO, S. M. *et al.* Thermal and photochemical nitric oxide release from S-Nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. **Biomaterials**, v. 24, n. 20, p. 3543-3553, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global burden disease death estimates by sex 2008**. Geneva: WHO, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/entity/gho/mortality_burden_disease/global_burden_disease_death_estimates_sex_2008.xls>. Acesso em: 24 out 2011.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GSNO

A curva de calibração utilizada para o cálculo da concentração de GSNO está representada na Figura 111. A equação da reta correspondente à curva foi $y = -0,00615 + 2,19091x$ e o coeficiente de correlação obtido foi acima de 0,999 ($R^2 = 0,99974$), evidenciando uma boa qualidade da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

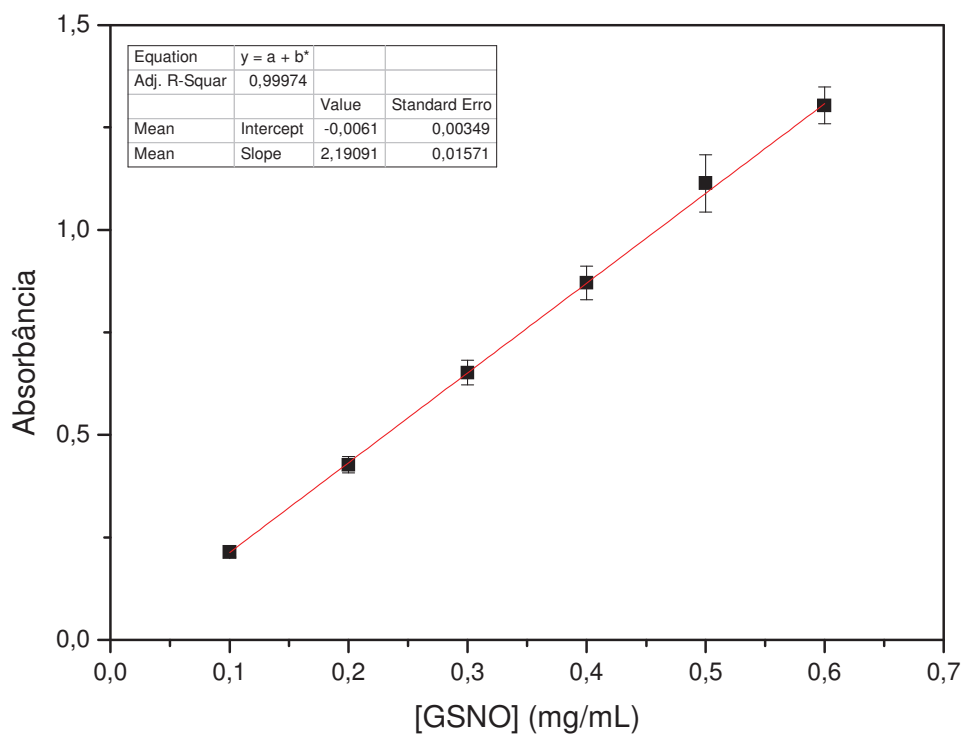


Figura 57 - Curva de calibração utilizada para o cálculo da concentração de GSNO

ANEXO B – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA/Unicamp

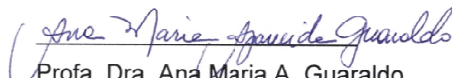
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Utilização da Cultura de Células no Monitoramento da Toxicidade a Xenobióticos e Avaliação do Estresse Oxidativo em Animais Induzidos à Queimadura por Injúria Térmica" (protocolo nº 2361-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo / Larissa Barbosa de Paula, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de abril de 2011.

Campinas, 04 de abril de 2011.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Nanopartículas Poliméricas e de Prata: Avaliação da Toxicidade *in vitro* e *in vivo* e do Processo de Cicatrização em Animais Submetidos à Queimadura Térmica":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

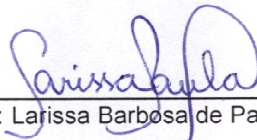
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

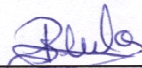
(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2361-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



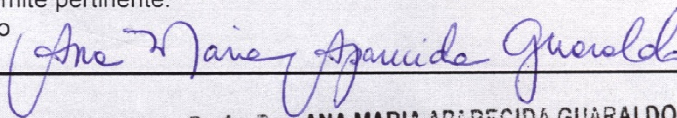
Aluno: Larissa Barbosa de Paula



Orientador: Profª. Dra. Patrícia da Silva Melo

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Carimbo e assinatura

Profª. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Nanoparticles in treatment of thermal injured rats: Is it safe?

P S Melo^{1,2}, P D Marcato³, S C Huber^{2,3}, I R Ferreira^{1,2}, L B de Paula³,
A B A Almeida⁴, N Durán^{3,5}, S Torsoni⁶, A B Seabra⁷ and O L Alves³

¹Biochemistry Department, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brazil

²VERIS, Campinas, SP, Brazil

³Chemistry Institute, UNICAMP, SP, Brazil

⁴SOBRAPAR, Campinas, SP, Brazil

⁵Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil,

⁶FCA, UNICAMP, SP, Brazil

⁷Universidade Federal de São Paulo, SP (UNIFESP), Diadema, SP, Brazil

E-mail: pmelo@unicamp.br

Abstract. The aim of this study was to assess whether thermal trauma induced oxidative stress altered the balance between oxidant and antioxidant systems in the blood of burn wound rats in the absence and presence of silver nanoparticles and S-nitrosoglutathione, GSNO. Free silver nanoparticles, free GSNO and silver nanoparticles + GSNO had no cytotoxic effects. Under anesthesia, the shaved dorsum of the rats was exposed to 90°C (burn group) water bath. Studied compounds were administered topically immediately and at 28 days after the burn injury, four times a day. Silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO were no toxic *in vitro* and *in vivo*. There were no significant differences in the levels of urea, creatinine, aminotransferases and hematological parameters, in control-burn groups (free silver nanoparticles) and treated-burn groups (free GSNO or silver nanoparticles + GSNO). There were no differences in lipid peroxidation and in the levels of protein carbonyls and glutathione, used as oxidative stress markers. A little inflammatory cell response, papillary dermis vascularization, fibroblasts differentiated into contractile myofibroblasts and the presence of a large amount of extracellular matrix were evidenced in treated groups following skin injury. These results indicate that silver nanoparticles and GSNO may provide an effective action on wound healing.

1. Introduction

The aim of wound healing is a speedy recovery with minimal scarring and maximal function. Wound healing proceeds through an overlapping pattern of events including coagulation, inflammation, proliferation, matrix and tissue remodelling. For this efficient and highly controlled repair process to take place, numerous cell-signalling events are required [1]. Silver has been used for centuries to

prevent and treat a variety of diseases including pleurodesis, cauterisation, and healing of skin wound [1]. The use of silver in the past has been restrained by the need to produce silver as a compound, thereby increasing the potential side effects. It has been reported [1] that the overall decrease in the inflammatory response at local wound sites in the silver nanoparticles group mimic the events observed in the further confirming the detrimental effects of inflammation on healing. They conclude that silver nanoparticles can modulate local and systemic inflammatory response following burn injury by cytokine modulation.

Nanotechnology includes the production of nanoparticles, defined as particles with three dimensions of less than 100 nm. Due to their small size, nanoparticles exhibit greater specific surface areas and surface energies, and generally increased surface reactivity than those of the conventional (larger) forms, leading to vastly different properties. For these reasons nanoparticles are being increasingly employed in a variety of consumer products, including paints, cosmetics, medicines, food and sun block lotions [2].

Silver ions have been used for centuries to prevent and treat a variety of diseases including pleurodesis, cauterization, and healing of skin wounds. The antibacterial property is important to prevent bacteria growth in the wound. Furthermore, some authors have reported possible pro-healing properties of silver [3]. For example, Tian and collaborators [1] verified that silver nanoparticles can promote wound healing and reduce scar appearance in a dose-dependent manner. Furthermore, the authors showed that silver nanoparticles act by decreasing inflammation through cytokine modulation. GSNO is an endogenous found nitric oxide (NO) donor that exhibit NO-like activities such as the inhibition of platelet adhesion, vasodilation, microbicidal actions, and wound healing [4-8]. Thus, combination of GSNO and silver nanoparticles has a great potential to promote wound healing.

The central role of liver and kidney in drug metabolism predisposes them to toxic injury. Hepatic metabolism is a mechanism that converts drugs and other compounds into products that are more easily excreted. A metabolite may have higher activity and/or greater toxicity than the original drug. Metabolites of the drugs that are excreted from kidneys may also cause cellular damage leading to kidney dysfunction.

The aim of this study was to assess whether thermal trauma induced oxidative stress altered the balance between oxidant and antioxidant systems in the blood of burn wound rats in the absence and presence of compounds (silver nanoparticles and GSNO). Previously, it was evaluated the cytotoxic effects of these substances in fibroblast V79 cell culture. Moreover, it was evaluated if these substances induce toxic effects in kidneys (urea and creatinine measurements), in liver (alanine and aspartate aminotransferases) and in hematological parameters.

2. Methods

2.1. Silver nanoparticles production

The fungal inoculates were prepared in a malt extract 2% and yeast extract 0.5% at 28°C in Petri plates. Silver reduction was carried out as described: approximately 10 g of *F. oxysporum* biomass was taken in a conical flask containing 100 mL of distilled water, kept for 72 h at 28°C and then the aqueous solution components were separated by filtration. To this solution, AgNO₃ (10⁻³M) was added and kept for several hours at 28°C [7,8].

2.2. Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis

The silver nanoparticles were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM) (Carl Zeiss CEM-902 transmission electron microscope, 80 KeV). For the examination of the silver particle, one drop of the particle dispersion was deposited on carbon-coated parlodion films supported in 300 mesh copper grids (Ted Pella).

2.3. GSNO synthesis

GSNO was synthesised as previously reported [9, 10]. In brief, glutathione (GSH) was nitrosated by adding equimolar amount of sodium nitrite (NaNO_2) in acidified aqueous solution.

2.4. Gel preparation

Carbopol 940® gel (0.1%) with propyleneglycol (5%) was prepared. Silver nanoparticles or GSNO (10-50% w/w) was added to the Carbopol gel.

2.5. Cytotoxicity of silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO

The cytotoxicity of silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO was assessed in a permanent lung fibroblast cell line (V79) culture derived from Chinese hamster [11]. These cells are commonly used for cytotoxicity studies [10]. V79 fibroblasts were grown as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU of penicillin/ml and 100 Ag of streptomycin/ml in a humidified incubator with 5% CO_2 in air at 37 °C. The cells were plated at a density of 3×10^4 cells/ml in 96-well plates. Forty-eight hours after cell seeding, semiconfluent cultures were exposed to silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO, at different concentrations (0 - 22 μM of silver nanoparticles). The maximum concentration of silver nanoparticles + GSNO was 22 μM of silver nanoparticles + 8 μM of GSNO. The cells were exposed for 24h to the test medium with or without the compounds studied (control). Each concentration was tested in six replicates in each of three separate experiments. At the end of the incubation, two independent endpoints for cytotoxicity (MTT reduction and neutral red uptake) were evaluated.

2.6. Endpoint tests for cytotoxicity

2.6.1. *Neutral red uptake (NRU)*: The NRU was measured by the method of Borefreund and Puerner [11]. Briefly, cells were washed once with PBS after removal of the culture medium. After 4 h of incubation with serum-free medium containing neutral red (50 $\mu\text{mol/L}$), the cells were washed in PBS, followed by the addition of 0.1 ml of a solution of 1% acetic acid and ethanol (50%) to each well to fix the cells and to remove the neutral red from the solution. The plates were shaken gently for 20 min on a plate shaker, and the absorbance of the solution was read at 540 nm (VersaMaxx, Tunable Microplate Reader).

2.6.2. *Methylthiazolotetrazolium (MTT) reduction*: The MTT reduction assay was performed as described by Denizot and Lang [14]. Briefly, cells were washed once with PBS before adding 0.1 ml of serum-free medium containing 0.05% of MTT salt to each well. After incubation for 5h, the culture medium was removed and 0.1 ml of ethanol was added to each well to solubilize the formazan formed. The plates were shaken gently for 10 min and the absorbance was measured at 570 nm (VersaMaxx, Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, Co., Sunnyvale, CA, USA).

2.7. Thermal injury animal and treatment

Male Wistar rats (250-300g; CEMIB/UNICAMP, Brazil) were used. Throughout the experiment, animals were housed in the same care facility with food and water available during a 12 hour light/dark cycle. Animal care was carried out in accordance with guidelines approved by the Ethical Animal Committee (Unicamp). Major thermal injury model has been previously described as a suitable model demonstrating the response associated with thermal injury [1]. Briefly, rats were anesthetized with ketamine/xylazine intraperitoneal 2% 20 mg/Kg; their dorsal body surface hair shaved off, and placed in an appropriately sized template device such that the shaved area of the skin on the animals' back was exposed. The template device was then lowered into a hot water bath (90°C) to immerse the exposed skin area in hot water for 10 seconds. With this technique, full thickness third degree thermal injury comprising 30% of the total body surface were obtained. Sham rats were

subjected to identical anesthesia and other treatments, except that they were immersed in 37°C water. After the thermal injury, five treatments were used on the dorsal skin: free Carbopol gel (positive control group, n=7, and negative control group, n=7); silver nanoparticles (1% m/v) (Ag group, n=7); free GSNO (GSNO group, n=7) (2 mM); silver nanoparticles + GSNO (1% m/v) (Ag-GSNO group, n=7) and silver sulfadiazine (1% m/v) (sulfadiazine group, n=7), four time a day. After 28 days, the animals were euthanized and its blood was collected for the biochemistry analyses and hematological parameters (toxic effects *in vivo*) and oxidative stress analysis. The burned dorsal skin was carefully removed for the histological analysis.

2.8. Toxic effects *in vivo*

2.8.1. *Biochemistry analyses*: Urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) values were analyzed in blood serum, using a Bioplus biochemical analyzer and LabTest reagents.

2.8.2. *Hematological parameters*: Leukocyte, erythrocyte and platelet counts and hemoglobin concentration were analyzed using KX21 system.

2.9. Oxidative stress analysis

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls and reduced glutathione (GSH) were measured as previously described [15].

2.10. Histological analysis

After 28 days of thermal injury and treatment the damaged skins were removed, fixed in 4% phosphate-buffered formalin, and embedded in paraffin. From the paraffin embedded tissue-blocks, 5 µm sections were serially cut and stained with hematoxylin-eosin (H&E). The sections were examined by light microscopy using a Leica FW 4500 B microscope.

3. Results and Discussion

3.1. Silver nanoparticles production

Spherical nanoparticles with size between 10-30 nm were observed by TEM analysis as shown the Figure 1.

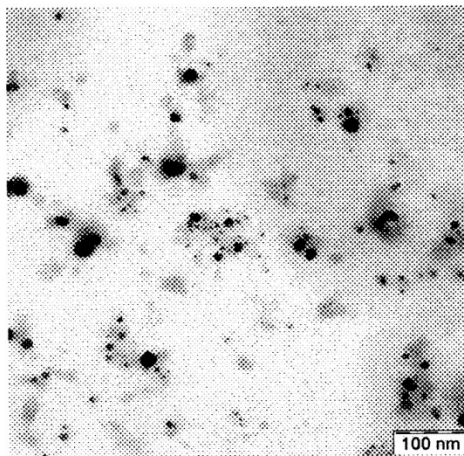


Figure 1. TEM micrograph of silver nanoparticles

3.2. Cytotoxicity of silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO

Free glutathione (GSH) has shown to be no cytotoxic to fibroblast V79 cells in the lysosomal (NRU) assay and slightly cytotoxic to mitochondrial (MTT) assay (15-20% around to 10 μ M – data not shown). Silver nanoparticles have shown to be no cytotoxic until 16 μ M, evaluated by NRU and MTT assays (Figure 2A). Silver nanoparticles + GSNO also have shown to be no cytotoxic in the same assays (100% of viability until 22 μ M concentration of silver nanoparticles and 8 μ M of GSNO) (Figure 2B).

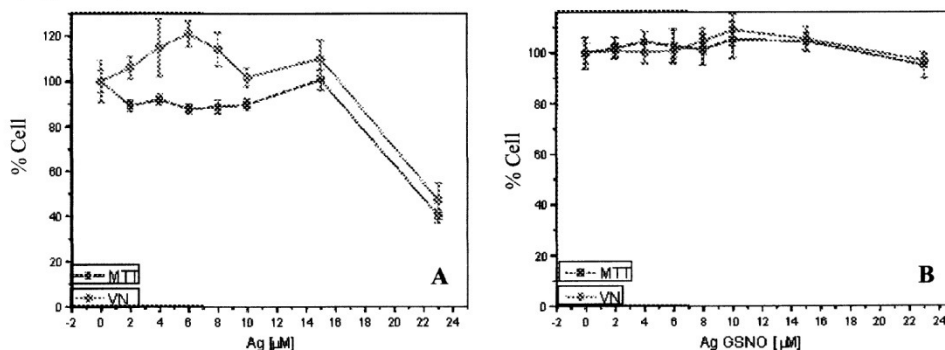


Figure 2. Cytotoxicity in V79 fibroblast cell culture in the presence of silver nanoparticles (Figure 2A) and silver nanoparticles + GSNO (Figure 2B).
 Concentration of silver nanoparticles 0-22 μ M.

3.3. Toxic effects *in vivo*

The effects of silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO on selected renal and liver function biochemistry tests (urea and creatinine concentrations, AST and ALT activities) in the animals submitted to thermal injury were presented in Table 1.

Table 1. Effects of thermal injury and/or treatment with silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO *in vivo*

	Sham	Negative Control	Positive Control	Ag	GSNO	Ag-GSNO	Sulfadiazine	p*
Urea (mg/dL)	3.85 \pm 0.50	4.14 \pm 0.67	4.00 \pm 0.37	3.83 \pm 0.30	3.17 \pm 0.48	5.28 \pm 0.68	4.14 \pm 0.45	p>0.05
Creatinine (mg/dL)	0.56 \pm 0.03	0.55 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02	0.45 \pm 0.02	0.63 \pm 0.02	0.54 \pm 0.04	0.49 \pm 0.01	p>0.05
AST (U/L)	60.43 \pm 16.99	62.43 \pm 15.82	75.71 \pm 27.15	81.67 \pm 25.93	96.83 \pm 15.82	89.57 \pm 8.24	81.57 \pm 5.54	p>0.05
ALT (U/L)	38.29 \pm 15.72	32.57 \pm 9.40	30.86 \pm 6.44	34.00 \pm 16.02	42.50 \pm 14.52	35.00 \pm 6.51	44.71 \pm 1.12	p>0.05
Leukocyte (cells)	6128.5 \pm 344.8	5971.4 \pm 353.7	7442.8 \pm 481.0	7457.1 \pm 642.4	7414.2 \pm 953.3	6771.4 \pm 437.9	7357.1 \pm 427.5	p>0.05
Erythrocyte (cells)	7.75 \pm 0.22	7.94 \pm 0.12	6.98 \pm 0.17	7.06 \pm 0.21	7.12 \pm 0.16	7.26 \pm 0.25	7.70 \pm 0.13	p>0.05
Platelet (cells)	779.28 \pm 70.67	783.00 \pm 50.12	894.14 \pm 29.17	689.14 \pm 92.17	744.28 \pm 88.14	934.00 \pm 58.04	870.71 \pm 42.37	p>0.05
Hb (g/dL)	13.72 \pm 0.32	14.07 \pm 0.21	12.37 \pm 0.22	12.55 \pm 0.22	12.61 \pm 0.27	12.90 \pm 0.28	13.82 \pm 0.17	p>0.05

*Compared to the Positive Control Group. One-Way ANOVA + Tukey Test at OriginPro 8.

Kidneys and liver are considered to be the most susceptible organs in the case of exposure and absorption of silver. The toxicity in kidneys can be evaluated by urea and creatinine measurements. The damaging effect of hepatotoxic substances on the liver is manifested by an increase of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). There were no differences between the groups in relation to these tests ($p > 0.05$), meaning that the thermal injury and/or the treatment have not shown toxicity in these biomarkers. The effects of silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO on the hematological parameters were also presented in Table 1. There were no differences between the groups in relation to these parameters.

3.4. Oxidative stress

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls and reduced glutathione (GSH) measurements have not shown any significant changes. These results indicate that the studied substances (silver nanoparticles and GSNO) have not induced an unbalance between oxidant and antioxidant systems.

3.5. Histological analysis

Animals exposed to thermal injury, treated only with Carbopol gel, presented inflammatory cells in higher amounts, few neovascularization and the extracellular matrix was poorly deposited. In Ag, GSNO, Ag-GSNO and Sulfadiazine groups, the histological analysis showed an extended area of connective tissue, where collagen and other extracellular matrix molecules were laid down. Moreover it was possible to observe a presence of myofibroblasts, cells involved with the generation of contractile force into the wound, in papillary dermis, but only a few leukocytes infiltration. A neovascularization in papillary dermis was evident. The negative control and sham groups have shown preserved epithelium and dermis, without morphological changes (Figure 3).

The ultimate goal for wound healing is a speedy recovery with minimal scarring and maximal function. Wound healing is a complex biological process that integrates the function of a variety of cell types and repair phases, including inflammation, proliferation, reepithelialization, remodeling, and maturation [8]. Rapid wound closure involves the migration of fibroblasts/keratinocytes to the wound site, where extracellular matrix (ECM) molecules are deposited. Histological analysis of tissue in MRL/MpJ mice lesions showed a delay in critical wound-healing events that culminated in a impairment of wound contraction [16]. Silver nanoparticles can modulate local and systemic inflammatory response following burn injury by cytokine modulation, that may be important in providing a permissive environment for scarless wound repair to proceed [1]. For many years, silver sulfadiazine has been the standard treatment for burns, but some of the benefits of pure silver appear to be lost. In the present study, we observed that silver nanoparticles could improve the healing of burn wounds by accelerating the process. Histologically, a delay in main events of healing was observed when wound was not treated. However a similar healing wound response in groups treated with Ag, Ag-GSNO, GSNO and those treated with sulfadiazine could be observed.

4. Conclusions

Our results demonstrated that silver nanoparticles and silver nanoparticles + GSNO were no toxic *in vitro* and *in vivo*. There were no significant differences in urea, creatinine and aminotransferases levels and in the hematological parameters between the control-burn groups (silver nanoparticles) and treated-burn groups (free GSNO or silver nanoparticles + GSNO forms). Moreover, there were no significant differences in lipid peroxidation (TBARS), protein carbonyls and reduced glutathione (GSH) between the groups. A little inflammatory cell response, papillary dermis vascularization, fibroblasts differentiated into contractile myofibroblasts and the presence of a large amount of extracellular matrix could be evidenced in treated groups following skin injury.

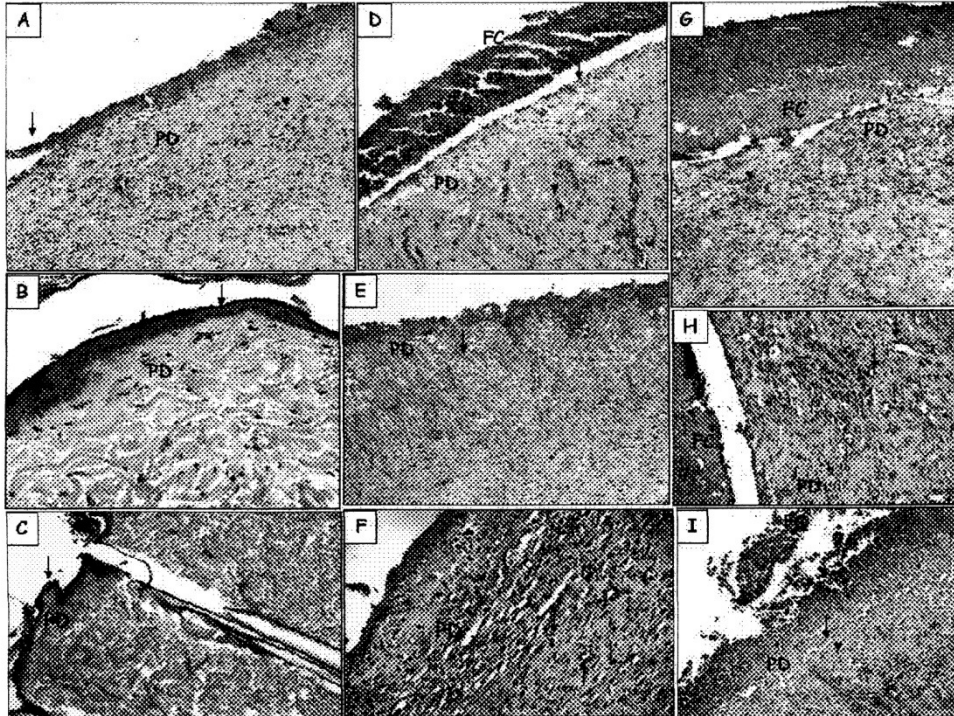


Figure 3. Photomicrography of dorsal skin from rats 28 days after thermal injury. **A:** Burned region was treated only with Carbopol gel after thermal injury (positive control). Arrowhead indicates presence of fibroblasts in hyperactive state in the papillary dermis (PD). Arrow indicates necrosis area (fibrin cap). H&E 100X; **B:** Healthy skin was treated only with Carbopol gel (negative control). It is possible to observe stratified epithelium preserved (arrow) and unchanged papillary dermis. H&E 100X; **C:** Sham. Epithelium and dermis similar to negative control. H&E 100X; **D:** Burned region was treated with silver nanoparticles after thermal injury. Arrowhead indicates presence of extracellular matrix with few fibroblasts in hyperactive state in the papillary dermis (PD) and basal cells (arrow). Tick area of fibrin cap (FC). H&E 100X; **E:** Burned region was treated with GSNO after thermal injury. Arrows indicates a large amount of extracellular matrix in papillary dermis and some myofibroblasts. H&E 100X; **F:** Burned region was treated with GSNO after thermal injury. It is possible to observe increases in dermis vascularity and some leukocyte migration (arrow). H&E 200X; **G:** Burned region was treated with silver nanoparticles + GSNO after thermal injury. Arrowhead indicates the presence of miofibroblasts in papillary dermis. Fibrin cap can be observed (FC). H&E 100X; **H:** Burned region was treated with silver nanoparticles + GSNO after thermal injury. Arrow shows increases in dermis vascularity and some leukocyte migration. Fibrin cap (FC) evident. H&E 200X; **I:** Burned region was treated with silver sulfadiazine after thermal injury. Presence of extracellular matrix (arrow) and miofibroblasts (arrowhead). H&E 100X.

Acknowledgements

Support from Brazilian Network of Nanocosmetics (MCT/CNPq), FAPESP (process number 2010/14949-4) and CNPq are acknowledged.

References

- [1] Tian J, Wong K K Y, Ho C M, Lok C N, Yu W Y, Che C M, Chiu J F and Tam P K H 2007 *J. Chem. Med. Chem.* **2**, 129
- [2] Teli M K, Mutalik S and Rajanikant G K 2010 *Cur. Pharm. Design.* **16**, 1882
- [3] Schaller M, Laude J, Bodewaldt H, Hamm G and Korting H C 2004 *Skin Pharmacol. Physiol.* **17**, 31
- [4] Seabra A B, da Silva R, de Souza G F P and de Oliveira M G 2008 *Artif. Organs* **32**, 262
- [5] Seabra A B, Pankotai E, Fehér M, Somlai A, Kiss L, Bíró L, Szabó C, Kollai M, de Oliveira M G and Lacza Z 2007 *Br. J. Dermatol.* **156**, 814
- [6] Seabra A B, Martins D, Simões M M S G, da Silva R, Brocchi M and de Oliveira M G 2010 *Artif. Organs* **34**, E204
- [7] Durán N, Marcato P D, Alves O L, De Souza G I H, Esposito E 2005. *J. Nanobiotechnol.* **3**, 1.
- [8] Durán N, Marcato P D, De Souza G I H, Alves O L, Esposito E 2007. *J. Biomed. Nanotechnol.* **3**, 203.
- [9] Amadeu T P, Seabra A B, de Oliveira M G and Costa A M A 2007 *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **21**, 629
- [10] Amadeu T P, Seabra A B, de Oliveira M G and Costa A M A 2008 *J. Surg Res.* **149**, 84
- [11] [Correa D H A, Melo P S, de Carvalho C A A, de Azevedo M B M, Durán N and Haun M 2005 *Eur. J. Pharmacol.* **510**, 17
- [12] de Conti R, Oliveira D A, Fernandes A M A P, Melo P S, Rodriguez J A, Haun M, Castro S L, Souza-Brito A R M and Durán N 1998 *In vitro Mol. Toxicol* **11**, 153
- [13] Borefreund E and Puerner J A 1984 *J. Tissue Cult. Methods* **9**, 7
- [14] Denizot F and Lang R 1986 *J. Immunol. Methods*, **89**, 271
- [15] Michailidis Y, Jamurta A Z, Nikolaidis M G, Fatouros I G, Koutedakis Y and Papassotiriou I 2007 *Med. Sci. Sport Exerc.* **39**, 1107
- [16] Davis T A, Amare M, Naik S, Kovalchuk A L and Tadaki D 2007 *Wound Repair Regen.* **15**, 577

Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: Cytotoxicity

P D Marcato¹, L F Adami¹, P S Melo^{2,3}, L B de Paula³, N Durán^{1,3} and
A B Seabra⁴

¹Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

²Metrocamp, Campinas, SP, Brazil

³Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil

³Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, Brazil

⁴Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

E-mail: amedeaseabra@gmail.com

Abstract. Nitric oxide (NO) is involved in several physiological processes, such as the control of vascular tone, the immune response and the wound healing process. Thus, there is a great interest in the development of NO-releasing drugs and in matrices which are able to stabilize and release NO locally in different tissues. Thiols, such as glutathione (GSH), are readily nitrosated to form the NO donors S-nitrosothiols (RSNOs). In this work, GSH, a precursor of the NO donor S-nitrosoglutathione (GSNO), was encapsulated into a mucoadhesive combination of alginate/chitosan nanoparticles. The encapsulated GSH was nitrosated in the alginate/chitosan nanoparticles by adding sodium nitrite, leading to the formation of encapsulated GSNO. The cytotoxicity characterization of the nanoparticles containing either GSH or GSNO showed that these materials were completely non cytotoxic to cellular viability. These results show that this novel nanostructure biomaterial has a great potential to be used in biomedical applications where NO has a therapeutic effect.

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is an endogenous free radical that plays a key role in the regulation of several physiological processes, such as the control of vasodilation, platelet interaction with the vessel wall, immune responses, wound healing and cellular communication [1-5]. The endogenous synthesis of NO is mediated through nitric oxide synthase (NOS) which catalyzes the conversion of *L*-arginine to NO and citrulline. At low concentrations, NO is quite stable and minimally reactive, however, at higher concentrations NO can interact with transition metals, heme-containing proteins, thiol groups leading to oxidation of functional groups on RNA, DNA and proteins [6]. The biological actions of NO have been shown to be dependent on its site and source of production, as well as its concentration.

Due to the multifaceted role of NO *in vivo*, there is a great interest on the developing of NO releasing molecular systems for biomedical applications, especially to treat important diseases [7]. In this context, many different classes of NO donors have been prepared and applied in biological systems [8]. Some studies suggested that cysteine thiols (RSHs) of bioactive peptides such as glutathione (GSH), the most abundant non-protein thiol found *in vivo*, act as NO carriers and donors in tissues [9]. Thiols are directly involved in the metabolism and mobilization of NO, and GSH forms S-nitrosoglutathione (GSNO) *in vivo* [10], which belongs to a class of compounds named S-nitrosothiols (RSNOs). GSNO and others RSNOs exhibit NO-like activities such as the inhibition of platelet adhesion, vasodilation, microbicidal actions, and wound healing [1,2,4,5,11,12]. However, the potential pharmacological applications of RSNOs, and in particular GSNO, require a vehicle since RSNOs are considered unstable in aqueous solution [9].

A promising approach that has been considered to promote the uses of RSNOs as NO donors in biomedical applications is either the direct incorporation of NO donors, such as RSNOs, into biopolymers or nanoparticles [7,13-15]. In both cases, NO can be released directed to the target site for prolonged periods of time and exerts its therapeutic effects, such as the promotion of cutaneous wound healing and dermal vasodilation, upon application *in vivo* [1,2,4,5].

However, a crucial issue with regards to propose the clinical uses of NO-releasing materials is the evaluation of the cytotoxicity of the NO donor molecules (RSNOs) and RSNOs-loaded to the polymers. It was reported that GSNO decreased neutrophil viability in a time and concentration-dependent manner, while GSH exposure alone did not enhance cell death or DNA fragmentation at any concentration studied, as assessed by a fluorescent viability/cytotoxicity assay [16].

In this work the tri-peptide GSH, precursor of the NO donor GSNO, was encapsulated into a mucoadhesive combination of alginate/chitosan. GSH-encapsulated alginate/chitosan nanoparticles were characterized, and the thiol was nitrosated to form encapsulated GSNO. The kinetics of NO release from GSNO-containing alginate/chitosan nanoparticles were monitored at physiological temperature, and compared to free GSNO. Finally, the cytotoxicity of either GSH- or GSNO-encapsulated were evaluated. The results showed that encapsulated GSH can be nitrosated to form GSNO-containing nanoparticles. The results suggest that this formulation is a potent candidate for pharmacological applications that require the release of controlled amounts of NO for prolonged periods of time, where NO can have its physiological actions, without severe side effects.

2. Methods

2.1. Preparation of polymeric nanoparticles with GSH

The alginate/chitosan nanoparticles containing GSH were prepared through ionic gelation method [17]. Briefly, it was prepared an aqueous chitosan solution (1.33%) with GSH. A ratio of alginate/chitosan solutions of 0.75 was obtained by dropping wise previous prepared chitosan aqueous solution into the alginate aqueous solution (0.005 g/100 mL) (pH 4.0), under magnetic stirring.

2.2. Characterization, encapsulation efficiency and physical stability of the alginate/chitosan nanoparticles

The average particle size (number average size) and size distribution of prepared nanoparticles as the zeta potential of alginate/chitosan ratio (0.75) were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Corp). The encapsulation efficiency of GSH in nanoparticles was determined by DTNB titration after ultrafiltration of the nanoparticles solution [12]. The physical stability alginate/chitosan nanoparticles at 0.75 ratio was monitored over 37 days at 4°C, by measuring the average particles sizes and surface charges, as described previously.

2.3. Nitrosation of GSH encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles

GSH (400 μM) encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles at ratio 0.75 and free GSH (400 μM) were nitrosated by adding equimolar amounts of sodium nitrite directly into polymeric aqueous solution (pH 4.0) at 336 nm ($\epsilon = 940 \text{ mol/L/cm}$), using an UV-Vis spectrophotometer [12].

2.4. Kinetic measurements of NO release from encapsulated GSNO and free GSNO

The kinetic curves of GSNO (400 μM) decomposition with NO release were monitored for free GSNO (GSNO in aqueous solution) and encapsulated GSNO in alginate/chitosan nanoparticles from the absorption changes at 336 nm.

2.5. Cytotoxicity of GSH and GSNO free and encapsulated in nanoparticles

The cytotoxicity of GSH and GSNO, free and encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles, was assessed in a permanent lung fibroblast cell line (V79) culture derived from Chinese hamster [18]. These cells are commonly used for cytotoxicity studies [19]. The cells were plated at a density of 3×10^4 cells/ml in 96-well plates. Forty-eight hours after cell seeding, semiconfluent cultures were exposed to free GSH, free GSNO, encapsulated GSH and encapsulated GSNO, at different concentrations (0 – 18 μM). The cells were exposed for 24 h to the test medium with or without the compounds studied (control). Each concentration was tested in six replicates in each of three separate experiments. At the end of the incubation, two independent endpoints tests for cytotoxicity (Methylthiazolotetrazolium reduction- MTT and neutral red uptake were evaluated [20,21].

3. Results and Discussion

3.1. Preparation and characterization of GSH-containing alginate/chitosan nanoparticles

Preparation of alginate/chitosan nanoparticles at ratio of 0.75, with and without GSH, showed average particles sizes of 361 and 301 nm, respectively, and positive surface charges with average values of +27 (with GSH) and + 22 mV (without GSH) (Table 1). Alginate/chitosan nanoparticles prepared showed the encapsulation efficiency of 27% (Table 1). These positively charged particles exhibited high stability after 37 days.

Table 1. Particles sizes, surface charge (Zeta potential), and encapsulation efficiency of alginate/chitosan nanoparticles.

Alginate/Chitosan ratios	GSH (mg)	Zeta Potential (mV)	Particle sizes (nm)	PdI	Encapsulation efficiency (%)
0.75	0	+22	301	0.316	---
0.75	5	+27	361	0.330	27

3.2. Nitrosation of GSH-encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles

GSH encapsulated in nanoparticles of alginate/chitosan was directly nitrosated by reacting with equimolar amount of sodium nitrite at pH 4.0. The formation of GSNO was confirmed by the detection of the characteristic GSNO absorption band at 336 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ transition) (data not shown). Thus, a NO-donor molecule (GSNO) could be prepared directly in alginate/chitosan suspension by directly nitrosation of encapsulated GSH in the nanoparticles.

3.3. Kinetics of GSNO decomposition with NO release from free GSNO and encapsulated GSNO in polymeric nanoparticles

The kinetic data of GSNO decomposition with NO release at 37°C for free GSNO, which corresponds to aqueous solution of GSNO (400 μM) at pH 4.0 and GSNO (400 μM) encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles (alginate/chitosan ratio 0.75) at pH 4.0 were analyzed. The decrease of

the intensity of the absorption band at 336 nm is assigned to the homolytic cleavage of the S-N bond, with GSNO decomposition leading to the release of NO and the formation of oxidized glutathione [9]. Either free GSNO or encapsulated were able to spontaneously decompose, releasing NO, under physiological temperature, for hours. However, for the first 3 h of the kinetic, the GSNO encapsulated in the nanoparticles can be considered stable (no change in the absorption at 336 nm). Only after 3 h of the kinetic, it was observed an increase in the rate of decomposition of encapsulated GSNO, with NO release. On the other side, the rate of free GSNO decomposition was observed to be continuously and linear from time zero to 7 h. Indeed, the rate of encapsulated GSNO decomposition was found to be $1.2 \times 10^{-2} \pm 0.2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ for 3 to 7 h. On the other hand, the rate of free GSNO decomposition was found to be $1.5 \times 10^{-2} \pm 0.2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ for 0 to 7 h. Therefore, encapsulation of GSNO in alginate/chitosan nanoparticles was responsible to decrease the rate of NO release, especially during the initial hours. This delay on the NO release may be due to the low diffusion rates of GSNO from the nanoparticles to the solution.

3.4. Cytotoxicity of free GSH, free GSNO and GSNO and GSH encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles

Free glutathione showed to be non cytotoxic to fibroblast V79 cells in the lysosomal (Neutral red) and slightly cytotoxic to mitochondrial (MTT) assays (15-20% around to 10 μM concentration), as is observed in Figure 1A. In the Figure 1B is shown that cytotoxicity in the case of GSNO was also not cytotoxic to fibroblast V79 cells in the lysosomal (Neutral red) and slightly cytotoxic to mitochondrial (MTT) assays (20% around to 16 μM concentration), as is observed in Figure 1B.

Alginate/chitosan nanoparticles with or without GSH or GSNO exhibited non cytotoxicity (till 18 μM concentration).

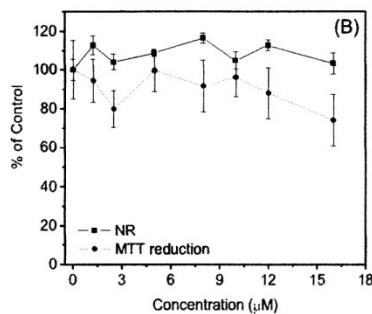


Figure 1. Viability graph in V79 cells with the cellular targets as MTT and NR of the free GSH (A) and free GSNO (B).

4. Conclusions

The kinetic of NO release from free GSNO compared with GSNO-encapsulated in alginate/chitosan revealed that the encapsulation of the NO donor resulted in a thermal and hydrolytic protection of GSNO leading to an enhancement of NO activity by a controlled and sustained NO release from this new biomaterial. The higher stability of encapsulated GSNO, compared to free GSNO enable the use of GSNO in pharmaceutical applications, such as wound healing, or others uses where the biological effects of NO are required.

Acknowledgements

Support from Brazilian Network of Nanobiotechnology, and Nanocosmetics (MCT/CNPq) and FAPESP (process number 2010/14949-4) are acknowledged.

References

- [1] Seabra A B, Fitzpatrick A, Paul J, De Oliveira M G and Weller R 2004 *Br. J. Dermatol.* **151**, 977
- [2] Seabra A B, Pankotai E, Fehér M, Somlai A, Kiss L, Bíró L, Szabó C, Kollai M, de Oliveira M G and Lacza Z 2007 *Br. J. Dermatol.* **156**, 814
- [3] Moore C, Tymvios C and Emerson M 2010 *Thromb. Haemost.* **104**, 342
- [4] Amadeu T P, Seabra A B, de Oliveira M G and Costa A M A 2007 *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **21**, 629
- [5] Amadeu T P, Seabra A B, de Oliveira M G and Costa A M A 2008 *J. Surg Res.* **149**, 84
- [6] Nahrevanian H and Amini M 2008 *Iranian J. Basic Med. Sci.* **11**, 197
- [7] Seabra A B and Durán N 2010 *J. Mater. Chem.* **20**, 1624
- [8] Kapadia M R, Chow L W, Tsihlis N D, Ahanchi S S, Eng J W, Murar J, Martinez J, Popowich D A, Jiang Q, Hrabie J A, Saavedra J E, Keefer L K, Hulvat J F, Stupp S I and Kibbe M R 2008 *J. Vasc. Surg.* **47**, 173.
- [9] de Oliveira M G, Shishido S M, Seabra A B and Morgon M H 2002 *J. Phys. Chem.* **106**, 8963.
- [10] Hogg N, Singh R J and Kalyanaraman B 1996 *FEBS Lett.* **382**, 223
- [11] Seabra A B, da Silva R, de Souza G F P and de Oliveira M G 2008 *Artif. Organs* **32**, 262
- [12] Seabra A B, Martins D, Simões M M S G, da Silva R, Brocchi M and de Oliveira M G 2010 *Artif. Organs* **34**, E204
- [13] Seabra A B, de Souza G F P, da Rocha L L, Eberlin M N, de Oliveira M G 2004 *Nitric Oxide* **11**, 263.
- [14] Seabra A B, da Silva R and de Oliveira M G 2005 *Biomacromolecules* **6**, 2512
- [15] Frost M C, Reynolds M and Meyerhoff M E 2005 *Biomaterials* **26**, 1685
- [16] Fortenberry J D, Owens M L and Brown L A S 1999 *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **276**, 435
- [17] Douglas K L, Piccirillo C A and Tabrizian M 2006 *J. Control. Release* **115**, 354
- [18] Correa D H A, Melo P S, de Carvalho C A A, de Azevedo M B M, Durán N and Haun M 2005 *Eur. J. Pharmacol.* **510**, 17
- [19] de Conti R, Oliveira D A, Fernandes A M A P, Melo P S, Rodriguez J A, Haun M, Castro S L, Souza-Brito A R M and Durán N 1998 *In vitro Mol. Toxicol* **11**, 153
- [20] Borefreund E and Puerner J A 1984 *J. Tissue Cult. Methods* **9**, 7
- [21] Denizot F and Lang R 1986 *J. Immunol. Methods*, **89**, 271

New Strategy for Controlled Release of Nitric Oxide

Amedea B. Seabra^{1,a}, Priscyla D. Marcato^{2,b}, Larissa B. de Paula^{2,c}
and Nelson Durán^{2,3,d}

¹Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Rua Prof. Artur Riedel, 275 - Jd. Eldorado - CEP 09972-270, Diadema, S.P., Brazil

²Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, S.P., Brazil

³Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Santo André, S.P., Brazil

^aamedea.seabra@gmail.com (corresponding author)

^bpmarcato@gmail.com

^claribpaula@yahoo.com.br

^ddurán@iqm.unicamp.br

Submitted: 10-11-2011 Received final version: 12-04-2012 Accepted: 29-5-2012

Keywords: Nitric Oxide, Nanoparticles, Controlled Release, Wound Healing, polymers, S-nitrosothiols.

Abstract. Nitric oxide (NO) is involved in several physiological processes, such as the control of vascular tone, the inhibition of platelet aggregation, smooth muscle cell replication, immune response and neuronal communication. Several pathologies have been associated to dysfunctions in the endogenous NO production. Thus, there is a great interest in the development of NO-releasing drugs and in matrices which are able to stabilize and release NO locally in different tissues. In this scenario, the preparation of NO-releasing nanomaterials, such as dendrimers, liposomes, metallic, silica, and polymeric nanoparticles, zeolites and metal organic frameworks, is a promising strategy for delivering NO in diverse applications, as discussed in this work.

Introduction

The endogenous found free radical nitric oxide (NO) is an important biologic mediator of several physiologic and pathophysiologic processes [1]. It is synthesized by the action of nitric oxide synthase (NOS), three NOS isoforms have been identified so far, which catalyze the oxidation of *L*-arginine to *L*-citrulline [2]. This ephemeral molecule play a key role in the cardiovascular system, since NO is a vasodilator that control our blood pressure and a potent inhibitor of platelet adhesion and aggregation [3]. Besides this vital role in the circulatory system, NO is also important in the digestive, immunological, muscular, and nervous systems [4]. NO is considered a unique biomolecule due to its chemical nature: small size, lack of charge, highly lipophilic, which makes NO a diffusely molecule [5]. Indeed, NO has the ability to diffuse through the cellular membranes, without the action of membranes channels or receptors, and to directly interact with intracellular targets [6]. There are two classes of small NO donor molecules: S-nitrosothiols (RSNOs) [7] and diazeniumdiolates (NONOates) [8]. The endogenous found RSNOs act as spontaneously NO donors due to the homolytic S-N bound cleavage with free NO release (Eq 1) [9]:



RSNOs are the main NO carriers and donors *in vivo* and have several of NO-like activities, such as the promotion of vasodilation and inhibition of platelet adhesion [10, 11]. Diazeniumdiolates (NONOates) are commercially available NO donors that release 2 mols of NO per NONOate molecule under physiological conditions [8].

Nitric Oxide-Releasing Nanomaterials

As NO is involved in diverse biochemical processes in humans, several pathologies have been associated to dysfunctions in the endogenous NO production. Thus, there is a great interest in the development of NO-releasing drugs and in matrices which are able to stabilize and release NO locally in different tissues and organs where NO might have its therapeutic effects [12]. For example, it has been reported that topical application of NO-releasing materials is responsible to accelerate and to improve the wound healing processes [13]. In the recent years, the tendency is to use the nanotechnology as valuable tool to create new strategies to controlled delivery NO in biomedical applications [12, 14]. In this context, different NO-releasing nanomaterials have been prepared and characterized, such as dendrimers, liposomes, metallic, silica, polymeric nanoparticles, nanoporous solid materials, zeolites. Some of these materials have been used in biomedical applications. A review of these nanomaterials is provided in Table 1, which outlines the categories of NO-releasing materials.

It has been reported the preparation of polyamide dendrimers functionalized with RSNOs groups, which are capable to store and release up to 2 μmol of NO [15]. Similarly, the exterior surface of the dendritic scaffold can be functionalized with diazeniumdiolates to release NO [16]. Recently, RSNO-polyamidoamine dendrimers was used to reduce ischemia/reperfusion injury in an isolated, perfused rat heart [17] due to NO release. The advantage of NO-releasing dendrimers materials is that the exterior surface of the dendrimers can be functionalized to load and release high amounts of NO [16, 18]. The disadvantage is the difficulty to carefully control the kinetic of NO release, the laborious dendrimers synthesis that involves the addition of organic solvents).

Liposomes comprised by phosphatidylcholine, cholesterol, and lipids were used as vehicle to delivery therapeutic amounts of NO [19]. It has been reported that cationic liposomes provide high NO loading capacity (6 μL NO/mg lipids) into cells, with a burst of NO release in the first half hour, followed by a slow NO release in the next hours. Moreover, light can be used as a useful tool to control the NO release from diverse nanomaterials [20]. In this context, RSNO was encapsulated in lipid vesicles with a diameter of 150 nm, and upon light stimulation, the rates of NO release from the nanomaterial was ready increased. Another smart NO-releasing nanomaterial is a thermo-sensitive phospholipid liposome, which is able to create a stable pH gradient in the nanoenvironment entrapping the NO donor molecule for a sustained heat and acid activated NO release [21]. The advantages of liposomes as NO-releasing nanomaterials is the high NO loading capacity, as for the dendrimers, and biocompatibility, since liposomes have been used in several dermatological applications as vehicle for different drugs.

Metallic nanoparticles are an important class of platform for NO-releasing nanomaterials due to their small size (less than 10 nm), stability, and high surface area for chemical modification [22]. Moreover, these materials can release NO under irradiation acting as photoactive materials in biomedical applications [23]. Metals such as gold, silver, iron, platinum can be used as platform for loading NO donors. In this context, it has been reported the preparation of hydrosoluble platinum nanoparticles decorated with NO-donor monolayer protected clusters [23]. Similar, water soluble NO-releasing gold nanoparticles were prepared by covalently bound diazeniumdiolate to the gold cluster [24]. Light can be used as a tool to control the NO release from photoactive gold nanoclusters.

Silica nanoparticles represent another important class of NO-donors nanomaterials. NO-releasing silica nanoparticles can be prepared by functionalization of silica scaffold with either diazeniumdiolates [25] or S-nitrosothiols groups [26]. The vantages of using silica are the diversity of the NO release kinetics, small and monodisperse nanoparticles size, low toxicity, high NO-loading capacity, and ability to release NO upon irradiation [26, 27, 28, 29]. Moreover, NO-releasing silica nanoparticles can be incorporated in biocompatible polymers films, leading to the formation of coating material that was shown to the thrombo-resistant [29].

Polymeric micro and nanoparticles comprised by different biofriendly and biodegradable polymers have been extensively used as drug-carrier vehicles for pharmacological applications, including NO-releasing materials. One of the most used polymers for preparing nanoparticles is poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) [30, 31]. In fact, the NO donor diazeniumdiolate was incorporated in PLGA microparticles. Besides PLGA, chitosan is another used biodegradable and biocompatible polymer in biomedical applications [32]. The NO donor diazeniumdiolates was employed to chemically modify the primary amine groups of chitosan, leading to the formation of chitosan/NO adducts. The great advantage of this material is the low toxicity, material degradability *in vivo* and lost cost production.

Biocompatible, biodegradable and micoadhesive NO-releasing nanoparticles comprised by alginate and chitosan was successfully prepared [33]. The NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO) can be readily synthesized by the nitrosation of glutathione (GSH). The precursor of GSNO, GSH was encapsulated into alginate/chitosan nanoparticles. The encapsulated GSH was nitrosated by the addition of aqueous sodium nitrite at pH 4, yielding GSNO-containing alginate/chitosan nanoparticles (Eq. 2).



The kinetics of NO release from free and encapsulated GSNO were monitored for more than 20 h at physiological temperature. It was observed that the incorporation of GSNO into alginate/chitosan nanoparticles greatly reduced the rates of NO release, compared to free GSNO. These results show that GSNO-containing nanoparticles can be used to controlled released NO to target sites where NO might have therapeutic effects. Moreover, the cytotoxicity characterization of the nanoparticles containing either GSH or GSNO showed that these materials were completely non cytotoxic to cellular viability [33].

Finally, metal organic frameworks (MOFs) and zeolites have been showing to be a promising NO-storage and release nanomaterials due to their architecture and chemical composition [34]. Zeolites are framework with cages and rings comprised by aluminosilicate microporous materials. The great advantage of this material is its high affinity for gaseous NO, which allows the storage up to 3.5 mmol of NO per gram of zeolites [35]. The NO release from zeolites is initiated upon water content and it can be tailored to the desired rates and amounts of NO release by changing the chemical structure of the zeolites [35, 36]. NO-releasing zeolites were shown to inhibit platelet adhesion and aggregation of blood-contact surfaces, indicating that this material can be use to prevent thromboses formation [36]. In addition, topical application of NO-releasing zeolites on human subjects was responsible to increase dermal blood flow due to the diffusion of NO across the skin [37]. Recently, it has been reported the antibacterial and bactericidal activities of NO-releasing zeolites against Gram-negative and Gram-positive bacteria [38].

Similar to zeolites, MOFs, which are also known as porous coordination polymers, are composed by a metal clusters connected three-dimensionally by organic linkers leading to the formation of crystalline nanoporous materials [34, 39]. As for zeolites, by changing the chemical composition of MFOs is it possible to control the rates of NO release and modulate it for a target biomedical application. The disadvantage of both zeolites and MOFs is their potential toxicity *in vivo*, since these materials contain transition metal ions [40].

Table 1. Summary of different types of scaffold to release NO.

Type of NO-releasing nanomaterial	Advantages	Disadvantages	References
Dendrimers	High NO loading capacity; functionalization of the exterior surface	Laborious synthesis that involves organic solvents, contain metals in their structure, which can lead to toxicity <i>in vivo</i> .	[15-18]
Liposomes	Biocompatibility	Limited NO loading capacity	[19-21]
Metallic nanoparticles	Small size stable nanoparticles, functionalization of the exterior surface, possibility to release NO under irradiation	Limited capacity to store NO, possible toxicity due to the presence of metals	[22-24]
Silica nanoparticles	Diversity on the kinetics of NO release, scaffold size, biocompatibility, ability to release NO under irradiation	Synthesis involves organic solvents	[25-29]
Polymeric nanoparticles	Biocompatibility, biodegradability	Expensive materials	[30-33]
Zeolites	Ability to tailored the NO release profile by changing the scaffold structure, high NO loading capacity, stability	Possible toxicity <i>in vivo</i>	[34-38]
Metal organic frameworks	Ability to tailored the NO release profile by changing the scaffold structure, high NO loading capacity, stability	contain metals in their structure, which can lead to toxicity	[34, 39, 40]

Conclusions

Table 1 summarizes the most important types of NO-releasing nanomaterials and highlights the advantages and disadvantage of each scaffold. It is clear from the revised literature that nanotechnology has been an important tool to the development of NO-releasing materials with great potential to be use in biomedical applications. In this scenario, different approaches have been designed to enable the use of this ephemeral free radical in pharmacological applications. Despite, the advantages of each particular type of nanomaterial, Table 1, it must be noted that these materials

are able to release NO over minutes and hours, most of them release NO with an initial burst. This kinetic of NO release is useful for short-term applications. In contrast, long-term NO release profile is required and is still a challenge for some medical applications, such as in cardiovascular applications. Indeed, continuous NO release over days and months is desired for coating blood compatible medical devices. This is still a major challenge to be overcome. The ideal NO-release nanomaterial needs to load high amounts of NO, release NO by a controlled manner for longer periods of time, be compatible, safe, easy to apply, economically feasible and easy to be scaled up.

References

- [1] S.M. Hollenberg, I. Cinel, Bench-to-bedside review: Nitric oxide in critical illness- update, *Crit. Care* 13 (2009) 218.
- [2] S. Umar, A. van der Laarse, Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart, *Mol. Cell. Biochem.* 333 (2010) 191-201.
- [3] H. Strijdom, N. Chamane, A. Lochner, Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions, *Cardiovasc. J. Afr.* 20 (2009) 303-310.
- [4] L.J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press, San Diego, 2000.
- [5] L.J. Ignarro, Nitric oxide: A unique endogenous signaling molecule in vascular biology (Nobel lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 1882-1892.
- [6] D. Looms, K. Tritsarlis, A.M. Pedersen, B. Nauntoft, S. Dissing, Nitric oxide signaling in salivary glands, *J. Oral Pathol.* 31 (2002) 569-584.
- [7] Y.H. Zhang, N. Hogg, S-nitrosothiols: cellular formation and transport, *Free Radical Bio. Med.* 38 (2005) 831-838.
- [8] M.R. Miller, I.L. Megson, Review – Recent developments in nitric oxide donor drugs, *Brit. J. Dermatol.* 151 (2007) 305-321.
- [9] M.G. de Oliveira, S.M. Shishido, A.B. Seabra, N.H. Morgon, Thermal stability of primary S-nitrosothiols: Roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 8963-8970.
- [10] A.B. Seabra, A. Fitzpatrick, J. Paul, M.G. de Oliveira, R. Weller, Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin, *Brit. J. Dermatol.* 151 (2004) 977-983.
- [11] A.B. Seabra, R. da Silva, G.F.P. de Souza, M.G. de Oliveira, Antithrombogenic polynitrosated polyester/poly(methyl methacrylate) blend for the coating of blood-contacting surfaces, *Artif. Organs* 32 (2008) 262-267.
- [12] A.B. Seabra, N. Duran, Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications, *J. Mat. Chem.* 20 (2010) 1624-1637.
- [13] J.L. Georgii, T.P. Amadeu, A.B. Seabra, M.G. de Oliveira, A.M.A. Costa, Topical S-nitrosoglutathione-releasing hydrogel improves healing of rat ischaemic wounds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 (2011) 612-619.

-
- [14] A.B. Seabra, Nitric oxide-releasing nanomaterials and skin care, In: S.S. Guterres, R. Beck, A. Polhmann (Eds), *Nanocosmetics and Nanomedicines: New approaches for skin care*, Springer, New York, 2011, pp. 253-268.
- [15] N.A. Stasko, T.H. Fischer, M.H. Schoenfisch, S-nitrosothiol-modified dendrimers as nitric oxide delivery vehicles, *Biomacromolecules* 9 (2008) 834-841.
- [16] N.A. Stasko., M.H. Schoenfisch, Dendrimers as a scaffold for nitric oxide release 128 (2006) 8265-8271.
- [17] T.A. Johnson, N.A. Stasko, J.L. Matthews, W.E. Cascio, E.L. Holmuhamedov, C.B. Johnson, M.H. Schoenfisch, *Nitric Oxide*, 22 (2010) 30-36.
- [18] U. Boas, P.M.H. Heegaard, Dendrimers in drug research, *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) 43-63.
- [19] S.L. Huang, P.H. Kee, H. Kim, M.R. Moody, S.M. Chrzanowski, R.C. MacDonald, D.D. McPherson, Nitric oxide-loaded echogenic liposomes for nitric oxide delivery and inhibition of intimal hyperplasia, *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (2009) 652-659.
- [20] S. Sortino, Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 2903-2913.
- [21] L.A. Tai, Y.C. Wang, C.S. Yang, Heat-activated sustaining nitric oxide release from zwitterionic diazeniumdiolates loaded in thermo-sensitive liposomes, *Nitric Oxide* 23 (2010) 60-64.
- [22] A.R. Rothrock, R.L. Donkers, M.H. Schoenfisch, Synthesis of nitric oxide-releasing gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 9362-9363.
- [23] M. Barone, M.T. Sciortino, D. Zaccaria, A. Mazzaglia, S. Sortino, Nitric oxide photocaging platinum nanoparticles with anticancer potential, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 5531-5536.
- [24] M.A. Polizzi, N.A. Stasko, M.H. Schoenfisch, Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles, *Langmuir* 23 (2007) 4938-4943.
- [25] J.H. Shin, S.K. Metzger, M.H. Schoenfisch, Synthesis of nitric oxide-releasing silica nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4612-4619.
- [26] D.A. Riccio, J.L. Nugent, M.H. Schoenfisch, Stober synthesis of nitric oxide-releasing S-nitrosothiol-modified silica particles, *Chem. Mater.* 23 (2011) 1727-1735.
- [27] J.H. Shin, M.H. Schoenfisch, Inorganic/organic hybrid silica nanoparticles as a nitric oxide delivery scaffold, *Chem. Mater.* 20 (2008) 239-249.
- [28] E.M. Hetrick, J.H. Shin, N.A. Stasko, C.B. Johnson, D.A. Wespe, E. Holmuhamedov, M.H. Schoenfisch, Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing nanoparticles, *ACS Nano* 2 (2008) 235-246.
- [29] H. Zhang, G.M. Annich, J. Miskulin, K. Stankiewicz, K. Osterholzer, S.I. Merz, R.H. Bartlett, M.E. Meyerhoff, Nitric oxide-releasing fumed silica particles: Synthesis, characterization, and biomedical application, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5015-5024.

-
- [30] P.D. Marcato, N. Duran, New aspects of nanopharmaceutical delivery systems, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8 (2008) 2216-2229.
- [31] P.S. Melo, M.M.M. de Azevedo, L. Frungillo, M.C. Anazetti, P.D. Marcato, N. Duran, Nanocytotoxicity: Violacein and violacein-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles acting on human leukemic cells, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 192-201.
- [32] V.A. Zhukovskii, Problems and prospects for development and production of surgical suture materials, *Fibre Chem.* 40 (2008) 208-216.
- [33] P.D. Marcato, L.F. Adami, P.S. Melo, N. Duran, A.B. Seabra, Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles: Cytotoxicity *J. Phys. Conf. Series* 304 (2011) 012045.
- [34] R.E. Morris, P.S. Wheatly, Gas storage in nanoporous materials, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 4966-4981.
- [35] A.K. Boes, P.S. Wheatly, B. Xiao, I.L. Megson, R.E. Morris, Simultaneous and cooperative gas storage and gas production using bifunctional zeolites, *Chem. Commun.* (2008) 6146-6148.
- [36] P.S. Wheatley, A.R. Butler, M.S. Crane, S. Fox, B. Xiao, A.G. Rossi, I.L. Megson, R.E. Morris, NO-releasing zeolites and their antithrombotic properties, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 502-509.
- [37] M. Mowbray, X. Tan, P.S. Wheatly, R.E. Morris, R.B. Weller, Topically applied nitric oxide induces T-lymphocyte infiltration in human skin, but minimal inflammation, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 352-360.
- [38] G. Narin, C.B. Albayrak, S. Ulku, Antibacterial and bactericidal activity of nitric oxide-releasing natural zeolites, *Apl. Clay Sci.* 50 (2010) 560-568.
- [39] M.J. Ingleson, R. Heck, J.A. Gould, M.J. Rosseinsky, Nitric oxide chemisorptions in a postsynthetically modified metal-organic framework, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 9986-9988.
- [40] B. Xiao, P.S. Wheatly, X. Zhao, A.J. Fletcher, S. Fox, A.G. Rossi, I.L. Megson, S. Bordiga, L. Regli, K.M. Thomas, R.E. Morris, High-capacity hydrogen and nitric oxide adsorption and storage in a metal-organic framework, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1203-1209.

Development of a Sustained-release System for Nitric Oxide Delivery using Alginate/Chitosan Nanoparticles

Priscyla D. Marcato^{a,b*}, Leonardo F. Adami^a, Raquel de Melo Barbosa^c, Patricia S. Melo^{c,d,e}, Iasmin R. Ferreira^d, Larissa de Paula^{c,d}, Nelson Durán^{a,c} and Amedea B. Seabra^f

^aInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6154, Campinas, CEP 13083-970, S.P., Brazil; ^bSchool of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, S.P., Brazil; ^cBiochemistry Department, Institute of Biology, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P., Brazil; ^dVeris Faculdades/METROCAMP, Campinas, S.P., Brazil; ^eFaculty of Applied Sciences, Unicamp, ^fCCNH-Universidade Federal do ABC-UFABC, Santo André, S.P., Brazil; ^gUniversidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Diadema, S.P., Brazil

Abstract: Free radical nitric oxide (NO) has been known to interact with various physiological processes, such as wound repair processes and control of vascular tone. However, NO is an unstable molecule and the development of NO delivery systems that enhance its stability has also been studied. In this work, alginate/chitosan nanoparticles have been studied as a drug delivery system of the S-nitrosoglutathione (GSNO) as NO donor. For this, glutathione, GSH, the GSNO precursor, was encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles. The presence of GSNO was confirmed by UV spectra at 336 nm. Alginate/chitosan nanoparticles with negative and positive surface charges were obtained by increasing the chitosan amount. The encapsulation efficiency (EE) relied on the nanoparticle zeta potential, obtaining 80% of EE for positive particles. The NO release from GSNO showed that polymeric nanoparticles lead to the stabilization of GSNO decomposition, at physiological temperature. Moreover, this system did not exhibit cytotoxicity for fibroblast V79 cells up to the maximum concentration tested (18 μmolL^{-1}). These results showed that alginate/chitosan nanoparticles are interesting particles to encapsulate NO donors for biomedical applications where NO might have a therapeutic effect.

Keywords: Polymeric nanoparticles, alginate, chitosan, nitric oxide, glutathione, cytotoxicity, s-nitrosoglutathione.

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is characterized as an endogenous free radical that exerts an important role in different physiological processes (e.g. control of vasodilation, inhibition of platelet adhesion and aggregation, immune responses, wound healing and cellular communication) [1-5]. Exciting discoveries have demonstrated that NO is a key antimicrobial, anticancer and antioxidant agent [6-8]. Activity of NO in biological systems depends on its site, source of production, and of its concentration. Therefore, the development of NO delivery system for biomedical applications is very advantageous for the treatment of different diseases, due to the advantages of drugs encapsulated in nanostructures such as sustained release and protection of the active agent from the environment, etc. [9,10]. In addition, many classes of NO donors have been synthesized and used in biological systems [11]. In this context, the S-nitrosothiol (RSNO) class, such as, S-nitrosoglutathione (GSNO), has been highlighted. This NO donor is produced by nitrosation of glutathione (GSH), a natural peptide [12-14]. However, due to the thermal instability of RSNOs, these molecules need a vehicle to be used in pharmacological applications [11]. Thus, RSNOs and other NO donors have been administered in biopolymers or after functionalization of polymers or nanoparticles [1,15-17]. The encapsulation of drug in nanostructure is a significant subject in biomedical applications because its ability to improve the drug stability and solubility; further it also prolongs the drug release, and also decreases the toxic effect [18-20]. Different nanostructures are used as drug delivery system such as, polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, liposome, mesoporous organosilica, mesoporous carbon, carbon nanotube, etc [21, 22]. In this way, polymeric nanoparticles appear as interesting carrier systems for NO donors [23]. The encapsulation of NO donors can protect them from

degradation, direct them to specified targets and release NO over prolonged periods, enhancing its activity with low concentration [9,24].

Several papers have described the preparation of different scaffolds for NO-releasing nanomaterials, including zeolites, dendrimers, metallic and polymeric nanoparticles for several biomedical applications [17]. For example, the bactericidal effects of NO release from zeolite against Gram-negative and Gram-positive bacteria have been reported [25]. Similar results were observed for NO release from silane hydrogel containing chitosan against methicillin-resistant *staphylococcus*, on bacterial abscesses in mice [26]. Marquete-Oliveira *et al.* [27] verified that NO donor (nitrosyl ruthenium complex) encapsulated in solid lipid nanoparticles was protected until photochemical NO generation. Furthermore, the NO release was a function of temperature and time [27]. The NO donor has also been encapsulated in PLGA microparticles for the treatment of female sexual arousal disorder and tested *in vitro* in vaginal epithelial cells. The results showed that the microencapsulation protected the NO donor from degradation the acidic vaginal environment. Moreover, a sustained NO release was observed and an improvement of NO penetration through vaginal epithelial cells was also verified [28]. These examples show the advantages of NO encapsulation in nanostructures.

Other interesting nanoparticles are based on natural polymers such as alginate, chitosan, eudragit, etc. Alginate is a natural polysaccharide extracted from brown seaweed [29]. Due to its water solubility, biodegradation under normal physiological conditions, biocompatibility, and mucoadhesive characteristics, it has been widely used in several biomedical applications [30]. Similarly, chitosan, a polysaccharide obtained by deacetylation of chitin, is an attractive material for several biomedical-related applications due to its biocompatibility, biodegradability and antibacterial actions [31,32]. Indeed, both alginate and chitosan are considered excellent biopolymers for the preparation of micro and nanoparticles [30]. Thus, due to these characteristics (biocompatibility, biodegradabil-

*Address correspondence to this author at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, S.P., Brazil; Tel/Fax: +55-16-3602-0490; E-mail: pmarcato@gmail.com

ity and mucoadhesive properties), in this work, these polymers (alginate and chitosan) were chosen to prepare mucoadhesive nanoparticles to encapsulate GSNO. In a preliminary communication in congress, it was observed that glutathione encapsulated in mucoadhesive polymers was able to be nitrosated and then liberate NO in a sustained way [33].

After GSH-encapsulated alginate/chitosan nanoparticles were characterized they were nitrosated to form encapsulated GSNO. The NO release from GSNO encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles was followed at 37°C and compared to free GSNO, under the same conditions. Furthermore, a cytotoxic study was carried out to evaluate the biomedical potential of this system.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chitosan (105 kDa / ~81% acetylation) was obtained from Polymar, Ciência e Nutrição S/A, Fortaleza, CE, Brazil. HCl was from Synth, Brazil. Alginate (~250 cps), glutathione (g-Glu-Cys-Glu, GSH), sodium nitrite, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetic acid, and phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, were obtained from Sigma, St. Louis, MO, USA and were used as received. All aqueous solutions were prepared using analytical grade water from a Millipore Milli-Q Gradient filtration system. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, penicillin and streptomycin were obtained from Nutricell, Campinas, SP, Brazil. Methylthiazolotetrazolium and neutral red dye were also obtained from Sigma.

Polymeric GSH Nanoparticles Synthesis

The ionic gelation method for alginate/chitosan nanoparticles containing GSH was used (modified from ref. [34]). Briefly, chitosan solution (1.33% in water) with GSH, (3.5-25 mg) was prepared. This solution (0.5 or 1 mL) was dropped into an alginate solution (50 µg mL⁻¹) at pH 4.0 under stirring, to obtain two different ratios of alginate/chitosan solutions: 1.5 and 0.75.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Particles were characterized by scanning electron microscopy (Jeol JSM-6360LV) at a voltage of 20 kV after prior coating with gold/palladium under vacuum by sputtering using a BAL-TEC apparatus. Secondary electron images were obtained.

Alginate/Chitosan Nanoparticles with and without GSH: Physical Characterization

The average size and size distribution of prepared nanoparticles of 0.75 and 1.5 alginate/chitosan ratios with and without GSH were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Corp) at 25°C in polystyrene cuvettes, with a path length of 10 mm. The zeta potential was measured in capillary cells with path lengths of 10 mm, using the Nano ZS Zetasizer. Measurements were performed with a solution of 0.1 mmol L⁻¹ sodium chloride.

Stability of the Alginate/Chitosan Nanoparticles

The physical stabilities of alginate/chitosan nanoparticles with 1.5 and 0.75 ratios, with GSH or without GSH, were analyzed by PCS, as described previously. During 35 days, the dispersion was kept at low temperature (4 °C) and followed the particle sizes and surface charges.

GSH Encapsulation Efficiency in Alginate/Chitosan Nanoparticles

The GSH encapsulation efficiency was measured by the UV-Vis method described in the literature [35]. Initially, no encapsulated GSH was separated from polymeric nanoparticles by ultracentrifugation. For this, 500 µL of GSH encapsulated in polymeric nanoparticles was filtered in a Microcon centrifugal filter device

containing ultrafiltration membranes (MWCO 10,000, Millipore). The amount of free GSH in the ultrafiltrates was measured by the 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) reaction, based on the absorbance at 412 nm ($\epsilon = 14.15 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) of the 2-nitro-5-thiobenzoate anion, which is generated in the reaction of GSH with DTNB [35]. A volume of 0.5 mL of ultrafiltered GSH was added to 0.5 mL of 12 mmol L⁻¹ of DTNB in PBS buffer (pH 7.4), after 5 min of incubation the absorbance at 412 nm was measured in a UV-VIS Agilent® 8453 spectrophotometer (SIGMA-D8130). The percentage of GSH encapsulation was determined by the described equation:

$$(\%) = (\text{mass of GSH encapsulated} / \text{mass of GSH total}) \times 100$$

Influence of pH on Diameter and Zeta Potential of GSH-containing Alginate/Chitosan Nanoparticles

The influence of pH from 4.00 to 10.0 on diameter and zeta potential of GSH-containing alginate/chitosan nanoparticles was determined with a MTP-2 Multi Purpose Titrator (Malvern®) coupled to the Malvern®. Zeta Sizer.

Nitrosation of GSH/Alginate/Chitosan Nanoparticles

25 mg of GSH (400 µmol L⁻¹) encapsulated in 0.75 alginate/chitosan nanoparticles ratio was nitrosated by 1:1 amounts of sodium nitrite directly into a polymeric aqueous dispersion (pH 4.0). The final solution was mixed with a magnetic stirrer for 40 min, using an ice bath and protected from light. Formation of GSNO/alginate/chitosan nanoparticles was characterized by the absorption band of the S-NO group (336 nm_{max}, $\epsilon = 940 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), using a UV-Vis spectrophotometer [35].

Similarly, free GSH (25 mg; 400 µmol L⁻¹) in aqueous acidified solution (pH 4.0) was nitrosated by adding 1:1 amounts of sodium nitrite, as described earlier, obtaining free GSNO in aqueous solution.

Kinetic Measurements of GSNO Decomposition with NO release from Encapsulated GSNO and Free GSNO at Physiological Temperature

The kinetic curves of GSNO (400 µmol L⁻¹) decomposition with NO release were monitored at 336 nm for either free GSNO (aqueous solution) or encapsulated one in alginate/chitosan nanoparticles (ratio 0.75). Kinetic data were taken at this wavelength at 30 min intervals at 37 °C for 21 h. The amount of NO released from free and encapsulated GSNO was calculated directly from the amount of GSNO decomposition, as previously described [36]. Each point of the kinetic curves represents the average of three independent experiments, with the error bars expressed by the standard error of the mean. NO release rates from GSNO decomposition were obtained by linear regression of the slopes of the curves.

Mathematical Modeling of the Release Experiments

The results of drugs release profiles from nanoparticles can allow important details about the release mechanism of active compound engaged. A new mathematical model has been proposed and this favors the understanding of the phenomena involved in drug delivery and adjustment of data with greater accuracy [37]. Korsmeyer-Peppas model (Eq. 1), a semi-empirical model, was applied to the GSNO release curves in order to identify the type of mechanism involved [38].

$$M(t)/M_{\infty} = kt^n \quad \text{Eq. 1}$$

With, M_t represented amount of GSNO releases at time t , M_{∞} total amount of GSNO releases at time t , K is a constant that considers structural and geometrical aspects of the system, and the value of the exponent (n) is used to characterize the release mechanism. The release exponent (n), according to Korsmeyer-Peppas, can be characterized by three different mechanisms (Fickian, anomalous, or Type II transport), when $n < 0.43$ the release is di-

rected by classical Fickian diffusion, $n > 0.85$ governed by Type II transport, involving polymer swelling and relaxation of the polymeric matrix and n between 0.43 and 0.85 shows anomalous transport kinetics, with a combination of the two diffusion mechanisms and Type II transport [39].

Cytotoxicity of Free and Encapsulated GSNO in Nanoparticles

The cytotoxicities of GSNO, both free and encapsulated in 0.75 alginate/chitosan nanoparticles ratio, were measured in a Chinese hamster lung fibroblast cell line (V79) culture [40]. V79 fibroblasts were grown as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU of penicillin/ml and 100 Ag of streptomycin/ml in a humidified incubator with 5% CO₂ in air at 37 °C. The cells were plated in 96-well plates (density of 3×10^4 cells/ml). Forty-eight hours after this process, semiconfluent cultures were exposed to free and encapsulated GSNO (0-18 μmolL^{-1} concentration). The compounds were studied after exposing the cells for 24 h to the test medium with or without control. In three experiments, each concentration was tested in six replicates. After incubation time the MTT and neutral red uptake assay were evaluated.

Endpoint Tests for Cytotoxicity

Neutral red Uptake

The neutral red uptake was measured by the method of Borefreund and Puerner (1984) [41]. Briefly, cells were washed once with PBS after removal of the culture medium. After 4 h of incubation with serum-free medium containing neutral red (50 μmolL^{-1}), the cells were washed in PBS, followed by the addition of 0.1 ml of a solution of 1% acetic acid and ethanol (50%) to each well to fix the cells and to remove the neutral red from the solution. The plates were shaken gently for 20 min on a plate shaker, and the absorbance of the solution was read at 540 nm (VersaMaxk, Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, Co., Sunnyvale, CA, USA).

Methylthiazole tetrazolium (MTT) Reduction

The MTT reduction assay was performed as described by Denizot and Lang [42]. Briefly, cells were washed once with PBS before adding 0.1 ml of serum-free medium containing 0.05% of MTT salt to each well. After incubation for 5 h, the culture medium was removed, and 0.1 ml of ethanol was added to each well to solubilize the formazan formed. The plates were shaken gently for 10 min and the absorbance was measured at 570 nm (VersaMaxk, Tunable Microplate Reader).

RESULTS AND DISCUSSION

GSH/alginate/Chitosan Nanoparticles Preparation

Nanoparticles of 1.5 Alginate/Chitosan Ratio

Preparation of 1.5 alginate/chitosan ratios with GSH and without GSH, gave an average diameters of 212 and 217 nm, respectively (Table 1). The zeta potential was negative and the value did

not change significantly with GSH encapsulation (Table 1). This negative value can be explained by considering the higher concentration of alginate compared with chitosan. Table 1 shows that both average diameters and the surface charges of the nanoparticles were not significantly changed upon encapsulation of GSH into the polymeric nanoparticles. However, efficiency of encapsulation of GSH into 1.5 alginate/chitosan ratio was only 1.0% (Table 1).

Nanoparticles of Alginate/Chitosan 0.75 Ratio

Preparation of 0.75 alginate/chitosan nanoparticles ratio with and without GSH gave particles sizes of around 361 and 301 nm, respectively, and positive surface charges values of +27 (with GSH) and +22 mV (without GSH) (Table 1). The positive potential indicates the presence of chitosan on the particle surfaces. This alteration improved the encapsulation efficiency to 80% showing to be better particles for GSH encapsulation than the particles prepared with the 1.5 alginate/chitosan ratio.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Fig. (1) shows the scanning electronic microscopy (SEM) of the 0.75 alginate/chitosan nanoparticles ratio with GSH. The non spherical particle shapes were observed which might be due to the dry process for the SEM analysis.

Physical Stability of Alginate/Chitosan Nanoparticles

Fig. (2) shows the variation of nanoparticle average sizes and Pdl for nanoparticles of alginate/chitosan at 1.5 and at 0.75 ratios without GSH for 35 days at 4 °C. The positively charged particles exhibit higher stability than the negatively charged particles, as shown in Fig. (2). After 35 days, the diameter of the negatively charged particles increased by 51% while the positive particle diameter increased by only 16% ($n = 3$) confirming that positive nanoparticles are better carriers than the negative nanoparticles.

Influence of pH on Diameter and Zeta Potential of Alginate/Chitosan Nanoparticles

In term of stability alginate/chitosan/GSH nanoparticles at different pHs was studied. Fig. (3A) shows the dependence of both particle size and zeta potential of alginate/chitosan/GSH nanoparticle (0.75 alginate:chitosan ratio) with pH. It can be observed that the increase of the pH (from 5 to 10) caused particles aggregation (particle sizes increased 300%). Furthermore, the zeta potential changed from positive (+17 mV) to negative (-33 mV) values by increasing the pH (Fig. 3A). However, for alginate/chitosan nanoparticles with GSH (ratio of alginate:chitosan 1.5) a smaller increase in particle size (163%) was observed with the increase in the pH, and the zeta potential decreased from -3 mV to -10 mV (Fig. 3B). In both cases, particle agglomeration was observed when the solution pH was similar to the chitosan pKa (~6.5). These results demonstrate that the surface properties of nanoparticles are predominantly governed by chitosan content.

Table 1. Zeta potential (surface charge), Particles sizes, and Encapsulation Efficiency of alginate/chitosan nanoparticles in three different ratios with and without GSH

Alginate/Chitosan ratios	GSH (mg)	Zeta Potential (mV)	Particles sizes (nm)	Pdl (polydispersity index)	Encapsulation efficiency (%)
0.750	0.0	+22	300.8	0.316	-
0.750	5.0	+27	361.4	0.330	80
1.500	0.0	-20	217.0	0.413	-
1.500	3.5	-23	211.6	0.400	1

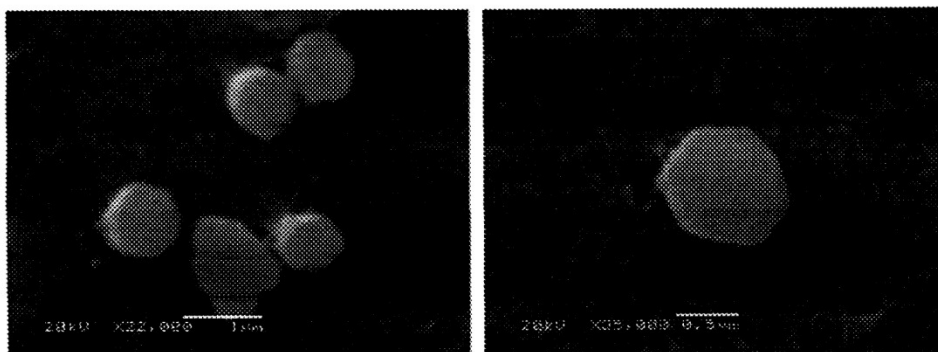


Fig. (1). SEM images of 0.75 alginate/chitosan/GSH nanoparticles ratio.

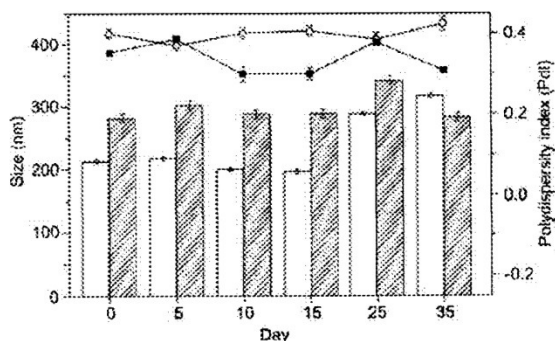


Fig. (2). Stability of alginate/chitosan nanoparticles at 1.5 and 0.75 ratios, without GSH at 4 °C for 35 days after preparation.

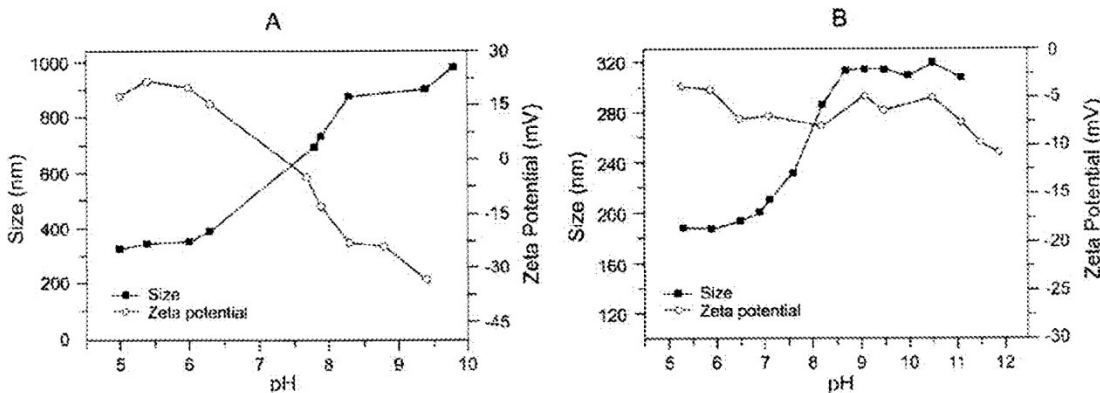


Fig. (3). Influence of pH on particle size (■) and on zeta potential (○) of alginate/chitosan/GSH nanoparticles. Alginate:chitosan ratio of: A) 1.5 and B) 0.75.

Nitrosation of Alginate/Chitosan/GSH Nanoparticles

Fig. (4) shows the ultraviolet spectra of alginate/chitosan nanoparticles containing GSH before and after nitrosation. In this figure, the band characteristic of GSNO at 336 nm can be observed after the reaction with sodium nitrite and the absence of this band before the reaction. This results shows that encapsulated GSH is readily nitrosated to GSNO inside the alginate/chitosan nanoparti-

cles. Therefore, GSNO can be prepared from alginate/chitosan/GSH suspension by nitrosation of GSH in the nanoparticles.

Kinetics of NO Release from Free GSNO and GSNO Encapsulated in Polymeric Nanoparticles

In Fig. (5), it is possible to see the kinetic curves of NO release for free GSNO and encapsulated GSNO (0.75 alginate/chitosan/GSNO nanoparticles ratio) for 21 h at 37° at pH 4.0. NO is spontaneously released from free and encapsulated GSNO through ther-

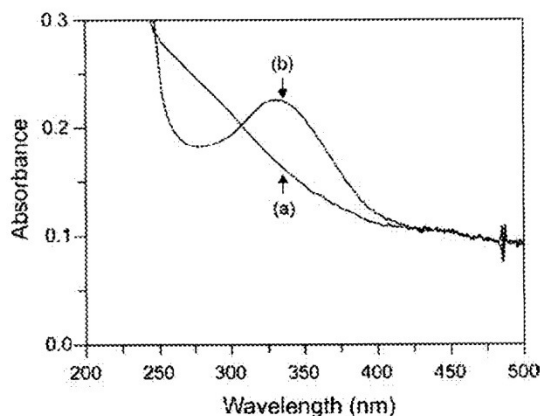


Fig. (4). Ultraviolet spectra of 0.75 alginate/chitosan/GSH nanoparticles ratio ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$ GSH) at pH 4.0: (a) before addition of nitrite and (b) after addition of equimolar amounts of nitrite.

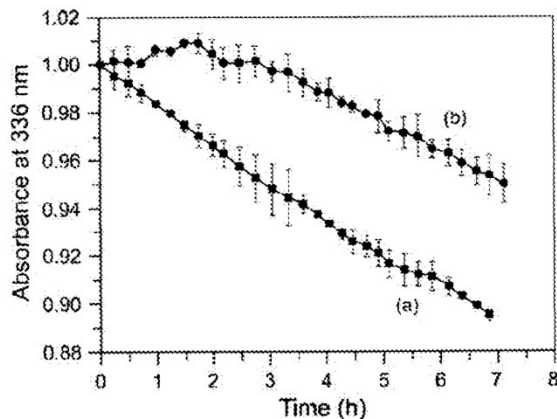


Fig. (5). Kinetic curves of NO released from GSNO ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$) at 37°C for 21 h at pH 4: (a) free GSNO; (b) GSNO encapsulated in 0.75 alginate/chitosan nanoparticles ratio.

mally S-N bond cleavage (hemolytic), with the concomitant formation of oxidized glutathione, according to Equation 2 [36]:



The release of GSNO from alginate/chitosan nanoparticles depends on various mechanisms, such as desorption, diffusion, particle erosion or the combination of these factors including desorption from the surface, diffusion through the pores or wall and disintegration, dissolution or erosion of the hydropolymeric structure [43–45]. It can be observed that the rate of NO release is greatly reduced for encapsulated GSNO (curve b) compared with free GSNO (curve a). Indeed, the rates of NO release were found to be 12.5 ± 0.11 and $0.46 \pm 0.07 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ for free and encapsulated GSNO, respectively. This data clearly indicated that the alginate/chitosan/GSNO nanoparticles can decrease 27-fold the rates of NO release from GSNO at 37°C . Moreover, after 21 h at 37°C , 62% of NO was released from free GSNO, in contrast, only 3% of NO was released from encapsulated GSNO.

The release profile data were treated using the Korsmeyer-Peppas model (Fig. 6) in order to obtain the values of the release constant (K) and the exponent (n) (Table 2) and identification of drug release mechanisms from nanostructured systems [38,43]. The

value of n was 0.35, indicating that the release mechanism involved a classical Fickian diffusion. The value of K was 1.306 min^{-1} and the fitting observed was 0.9046.

These results show that the encapsulation of the NO donor into nanoparticles can be used to control NO release for longer durations, by greatly decreasing the rates of thermal GSNO decomposition with consequent NO release. This fact can be explained due to the low diffusion rates of the encapsulated GSNO nanoparticles to the aqueous solution.

It must be noted that the biological actions of NO depend on the flux of NO released. Lower NO concentrations, in the range of nano-micro molar are required for the therapeutic effects of NO, such as the increasing of blood flow and promotion of wound healing [4,17], whereas, higher amounts of NO released have bacterial, viricidal, leishmanicidal and tumoricidal activities [17,46]. The amount of GSNO encapsulated into alginate/chitosan nanoparticles can be adjusted to the desired biomedical application. A kinetic profile of NO release, as shown in Fig. (5b), can be used for biological applications (wound healing or platelet adhesion and aggregation inhibition). In both cases, micro molar amounts of NO are required to be released for long periods of time [17].

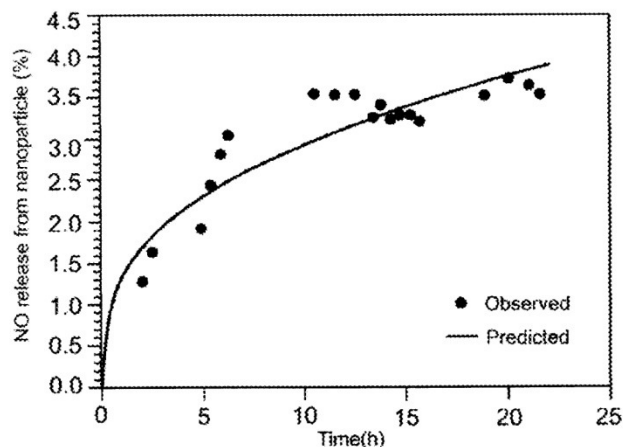


Fig. (6). Results obtained using the Korsmeyer-Peppas mathematical model applied to GSNO encapsulated in alginate/chitosan nanoparticle.

Table 2. Values of the release constant (K), exponent (n) and correlation coefficient (r), for the GSNO encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles.

Sample	K(min ⁻¹)	n	r
GSNO encapsulated in alginate/chitosan nanoparticles	1.306	0.3508	0.9046

Cytotoxicity Study

Free GSNO did not show cytotoxicity to fibroblast V79 cells in the Neutral red assay (lysosomal) and was slightly cytotoxic in the MTT assay (mitochondrial) (20% at around 16 μmolL^{-1} , as is observed in Fig. (7)). Similarly, it was reported that GSNO decreased neutrophil viability as followed by a fluorescent viability/cytotoxicity assay. In this case a time and concentration-dependent manner was observed [47].

None of alginate/chitosan nanoparticles exhibited cytotoxicity to fibroblast V79 cells (up to 18 μmolL^{-1} concentration). This means that the slight cytotoxicity observed for free GSNO was completely eliminated by its incorporation in alginate/chitosan nanoparticles (Fig. 7). Similar results were reported by Hetrick *et al.*, (2008) [48], in which NO-releasing silica nanoparticles were found to be nontoxic to mammalian fibroblast cells, at concentra-

tions able to kill bacteria, while the free NO donor exhibited a significant toxicity to fibroblast cells.

CONCLUSION

GSNO encapsulated into biodegradable alginate/chitosan nanoparticles can be readily nitrosated leading to the formation of GSNO in the nanoparticles. The rates of NO release from GSNO are greatly reduced due to GSNO encapsulation into biodegradable and non-toxic nanoparticles. Furthermore, the GSNO encapsulation decreased the cytotoxic effect of GSNO in fibroblast V79 cells. Thus, the better stability of encapsulated GSNO compared to free GSNO and the absence of cytotoxicity of alginate/chitosan/GSNO nanoparticles enables the use this new NO-nanocarrier in pharmaceutical applications, or other uses where the NO effects are required, without severe side effects.

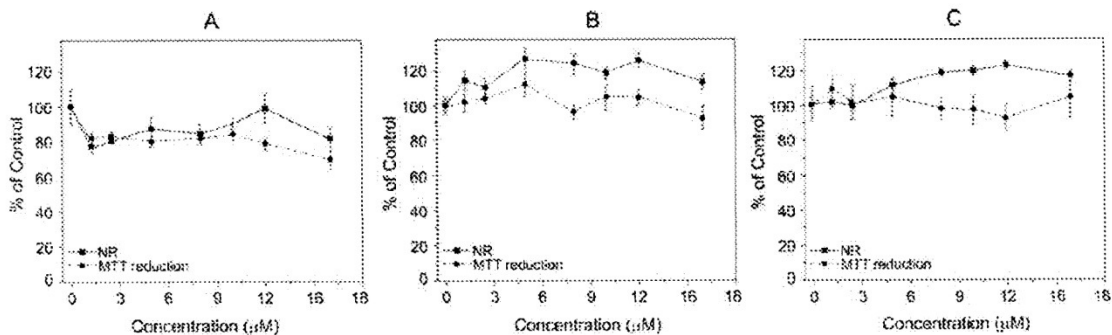


Fig. (7). Cell viability of V79 fibroblast treated with: a) free GSNO, b) alginate/chitosan (ratio of 0.75), c) GSNO encapsulated in alginate/chitosan (ratio of 0.75).

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Brazilian Networks of Nanobiotechnology, Nanocosmetics (MCT/CNPq) and Nanotoxicology (MCT/CNPq) FAPESP support have been acknowledged.

REFERENCES

- [1] Seabra, A.B.; Fitzpatrick, A.; Paul, J.; De Oliveira, M.G.; Weller, R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological NO donors in human skin. *Br. J. Dermatol.*, **2004**, *151*, 977-983.
- [2] Seabra, A.B.; Pankotai, E.; Fehér, M.; Somlai, A.; Kiss, L.; Biró, L.; Szabó, C.; Kollai, M.; De Oliveira, M.G.; Lacza, Z. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Dermatol.*, **2007**, *156*, 814-818.
- [3] Moore, C.; Tymvios, C.; Emerson, M. Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase. *Thromb. Haemost.*, **2010**, *104*, 342-349.
- [4] Amadeu, T.P.; Seabra, A.B.; De Oliveira, M.G.; Costa, A. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2007**, *21*, 629-637.
- [5] Amadeu, T.P.; Seabra, A.B.; De Oliveira, M.G.; Monte-Alto-Costa, A. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. *J. Surg. Res.*, **2008**, *149*, 84-93.
- [6] Seabra, A.B.; Martins, D.; Simões, M.M.S.G.; da Silva, R.; Brocchi, M.; de Oliveira, M.G. Antibacterial nitric oxide-releasing polyester for the coating of blood-contacting artificial materials. *Artif. Organs*, **2010**, *34*, E204-E214.
- [7] Simplicio, F.I.; Seabra, A.B.; de Souza, G.F.P.; de Oliveira, M.G. *In vitro* inhibition of linoleic acid peroxidation by primary S-nitrosothiols. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, *21*, 1885-1895.
- [8] Hirst, D.; Robson, T. Nitric oxide in cancer therapeutics: Interaction with cytotoxic chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.*, **2010**, *16*, 411-420.
- [9] Marcato, P.D.; Caverzan, J.; Rossi-Bergmann, B.; Pinto, E.F.; Machado, D.; Silva, R.A.; Justo, G.Z.; Ferreira, C.V.; Durán, N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2011**, *11*, 1880-1886.
- [10] Durán, N.; Marcato, P.D.; Teixeira, Z.; Durán, M.; Costa, F.T.M.; Brocchi, M. State of art of nanobiotechnology applications in neglected diseases. *Curr. Nanosci.*, **2009**, *5*, 396-408.
- [11] Kapadia, M.R.; Chow, L.W.; Tsihlis, N.D.; Ahanchi, S.S.; Eng, J.W.; Murar, J.; Martinez, J.; Popovich, D.A.; Jiang, Q.; Hrabie, J.A.; Saavedra, J.E.; Keefer, L.K.; Hulvat, J.F.; Stupp, S.I.; Kibbe, M.R. Nitric oxide and nanotechnology: a novel approach to inhibit neointimal hyperplasia. *J. Vasc. Surg.*, **2008**, *47*, 173-182.
- [12] De Oliveira, M.G.; Shishido, S.M.; Seabra, A.B.; Morgon, M.H. Thermal stability of primary S-Nitrosothiols: Roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem.*, **2002**, *106*, 8963-8970.
- [13] Gaston, B. Nitric oxide and thiol groups. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1411*, 323-333.
- [14] Hogg, N.; Singh, R.J.; Kalyanaraman, B. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.*, **1996**, *382*, 223-228.
- [15] Seabra, A.B.; da Silva, R.; de Oliveira, M.G. Polynitrosated polyesters: Preparation, characterization, and potential use for topical nitric oxide release. *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 2512-2520.
- [16] Frost, M.C.; Reynolds, M.; Meyerhoff, M.E. An *in vitro* method for assessing biomaterial-associated platelet activation. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 1685-1693.
- [17] Seabra, A.B.; Durán, N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 1624-1637.
- [18] Ariga, K.; Lvov, Y.M.; Kawakami, K.; Ji, Q.; Hill, J.P. Layer-by-Layer Self-Assembled Shells for Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2011**, *63*, 762-771.
- [19] Ariga, K.; Ji, Q.; Hill, J.P.; Bando, Y.; Aono, M. Forming nanomaterials as layered functional structures toward materials nanoarchitectonics. *NPG Asia Materials*, **2012**, *4*, e17.
- [20] Doane, T.L.; Burda, C. The unique role of nanoparticles in imaging, drug delivery and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2885-2911.
- [21] Ariga, K.; Vinu, A.; Yamauchi, Y.; Ji, Q.; Hill, J.P. Nanoarchitectonics for Mesoporous Materials. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2012**, *85*, 1-32.
- [22] Marcato, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Rev. Eletrônica Farmacia*, **2009**, *6*, 1-37.
- [23] Colson, Y.L.; Grinstaff, Mark W. Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv. Mater.*, **2012**, *24*, 3878-3886.
- [24] Marcato, P.D.; Durán, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2008**, *8*, 2216-2219.
- [25] Narin, G.; Albayrak, D.B.; Ülkü, S. Antibacterial and bactericidal activity of nitric oxide-releasing natural zeolite. *Appl. Clay Sci.*, **2010**, *50*, 560-568.
- [26] Han, G.; Martinez, L.R.; Mihu, M.R.; Friedman, A.J.; Nosanchuk, J.D. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *staphylococcus aureus* abscesses in a murine model of infection. *PLoS One*, **2009**, *4*, e7804-e7815.
- [27] Marquete-Oliveira, F.; de Almeida, D.C.; Taveira, S.F.; Vermeulen, D.M.; de Oliveira, A.R.M.; da Silva, R.S.; Lopez, R.F.V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: Improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, *53*, 843-851.
- [28] Yoo, J.W.; Lee, J.S.; Lee, C.H. Characterization of nitric oxide-releasing microparticles for the mucosal delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2010**, *92A*, 233-243.
- [29] Domachuk, P.; Tsiouris, K.; Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. Bio-microfluidics: Biomaterials and biomimetic designs. *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 249-260.
- [30] Sundar, S.; Kundu, J.; Kundu, S.C. Biopolymeric nanoparticles. *Sci. Technol. Adv. Mat.*, **2010**, *11*, article number 014104.
- [31] Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem. Pharm. Bull.*, **2010**, *58*, 1423-1430.
- [32] Ridolfi, D.M.; Marcato, P.D.; Justo, G.Z.; Cordil, L.; Machado, D.; Durán, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids Surf. B-Biointerfaces*, **2012**, *93*, 36-40.
- [33] Marcato, P.D.; Adami, L.F.; Melo, P.S.; Seabra, A.B.; Durán, N. Glutathione and S-nitrosoglutathione in alginate/chitosan nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.*, **2004**, *304*, 012045.
- [34] Douglas, K.L.; Piccirillo, C.A.; Tabrizian, M.J. Effects of alginate inclusion on the vector properties of chitosan-based nanoparticles. *J. Control. Release*, **2006**, *115*, 354-361.
- [35] Seabra, A.B.; Martins, D.; Simões, M.M.S.G.; da Silva, R.; Brocchi, M.; de Oliveira, M.G. Antibacterial nitric oxide-releasing polyester for the coating of blood-contacting artificial materials. *Artif. Organs*, **2010**, *34*, E204-E214.
- [36] Shishido, S.M.; Seabra, A.B.; Loh, W.; De Oliveira, M.G. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in pluronic F-127 gels: Potential uses for local nitric oxide release. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 3543-3553.
- [37] Costa, P.; Manuel, J.; Lobo, S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13** (2001) 123-133. J. Siepmann, F. Siepmann, *Mathematical modeling of drug delivery. Int. J. Pharm.*, **2008**, *364*, 320-343.
- [38] Grillo, R.; de Melo, N.F.S.; de Araujo, D.R.; de Paula, E.; Rosa, A.H.; Fraceto, L.F. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. *J. Drug Target.*, **2010**, *18*, 688-699.
- [39] Korsmeyer, R.W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, **1983**, *15*, 25-35.
- [40] Corrêa, D.H.A.; Melo, P.S.; De Carvalho, C.A.A.; De Azevedo, M.B.M.; Durán, N.; Haun, M. Dehydrocortin and its beta-cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **2005**, *510*, 17-24.
- [41] Borefreund, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (Htd/NR 90). *J. Tissue Cult. Method*, **1984**, *9*, 7-9.
- [42] Denizot, F.; Lang, R.J. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol. Method.*, **1986**, *89*, 271-277.
- [43] Grillo, R.; dos Santos, N. Z. P.; Maruyama, C. R.; Rosa, A. H.; de Lima, R.; Fraceto, L. F. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, **2012**, *231*-232, 1-9.
- [44] Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A.; Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *385*, 113-142.
- [45] Cruz, L.; Soares, L. U.; Costa, T. D.; Mezzalana, G.; da Silveira, N. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *313*, 198-205.
- [46] Kleinert, H.; Pautz, A.; Linker, K.; Schwarz, P.M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, **2004**, *500*, 255-266.

[47] Fortenberry, J.D.; Owens, M.L.; Brown, L.A.S. S-nitrosoglutathione enhances neutrophil DNA fragmentation and cell death. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **1999**, *276*, L435-L442.

[48] Hetrick, E.M.; Shin, J.H.; Stasko, N.A.; Johnson, C.B.; Wespe, D.A.; Holmuhamedov, E.; Schoenfisch, M.H. Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *ACS Nano*, **2008**, *2*, 235-246.

Received: October 28, 2011

Revised: May 22, 2012

Accepted: July 6, 2012