



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**SAUL BARBOSA DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA DE NANOPARTÍCULA DE PRATA  
ESTABILIZADA COM COLÁGENO E GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium  
occidentale L.*)**

PARNAÍBA – PI  
AGOSTO - 2018

SAUL BARBOSA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA DE NANOPARTÍCULA DE PRATA  
ESTABILIZADA COM COLÁGENO E GOMA DO CAJUEIRO (*ANACARDIUM  
OCIDENTALE L.*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em ciências biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras**

PARNAÍBA – PI  
AGOSTO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

O482a Oliveira, Saul Barbosa de

Atividade antiinflamatória de nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) [recurso eletrônico] / Saul Barbosa de Oliveira. – 2018.

1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras.

1. Nanopartículas de Prata. 2. Anti-inflamatória. 3. Antioxidante 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação. I. Título.

CDD: 615.4

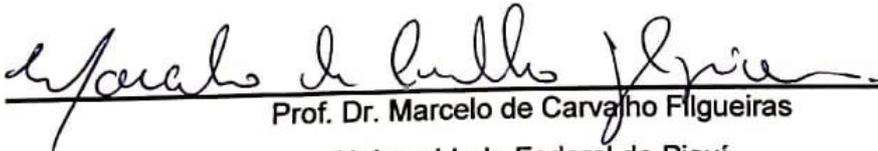
**SAUL BARBOSA DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE NANOPARTÍCULA DE PRATA  
ESTABILIZADA COM COLÁGENO E GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium  
occidentale L.*)**

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-graduação em  
ciências biomédicas da Universidade  
Federal do Piauí, *Campus* Ministro  
Reis Velloso, como requisito para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biomédicas.

Aprovado Em: 24/08/2018

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Figueiras  
Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Vinicius Saura Cardoso  
Universidade Federal do Piauí

  
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros  
Universidade Federal do Piauí

**E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!**

**Veronica Shoffstal**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à todos que, direta ou indiretamente, participaram desse processo, à todos o meu muito obrigado!

## RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNP) têm emergido como uma importante classe de nanomateriais com diversas aplicações médicas. O interesse em realizar pesquisas usando proteínas e nanopartículas de prata (AgNPs) é amplo pois a atividade anti-inflamatória desses tipos específicos de agrupamentos em nanoescala é desconhecido. O estudo teve como objetivo descrever o efeito da administração intraperitoneal de nanopartículas de prata estabilizadas com colágeno e goma do cajueiro em modelos experimentais de edema de pata e peritonite induzidos por carragenina. Foi analisado o potencial de inibição da formação de edema de pata através do tratamento com a nanopartícula de prata citada anteriormente nas doses de 50µl/kg, 100µl/kg e 150µl/kg aplicadas de forma intraperitoneal e sua ação na atividade da enzima mieloperoxidase, nesses ensaios foi determinada a melhor dose para a continuidade do estudo. Em sequência foi realizado a peritonite induzida por carragenina, para avaliação do estresse oxidativo e da atividade anti-oxidante da melhor dose da nanopartícula testada no estudo, comparando com o grupo carragenina, com o grupo salina e com o grupo de tratamento anti-inflamatório padrão indometacina, através análise de glutathione reduzida (GSH), nitrato e nitrito, superóxido dismutase. Os resultados sugerem que a nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro na dose de 3ml/kg possui potencial antiinflamatório ao inibir a formação do edema em 70% na terceira hora de experimento. O composto também demonstrou reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase de forma significativa quando comparado ao grupo controle. O potencial antioxidante da nanopartícula é demonstrado pela redução dos níveis de nitrito e manutenção dos níveis de GSH e SOD quando comparados ao grupo carragenina. Conclui-se que a nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro possui um potencial antiinflamatório, através da inibição do edema de pata e da migração neutrofílica e potencial antioxidante através da manutenção dos níveis de GSH e SOD e diminuição dos níveis de Nitrito.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata. Anti-inflamatório. Antioxidante. Estresse Oxidativo. Inflamação.

## ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNP) have emerged as an important class of nanomaterials with diverse medical applications. The interest in conducting research using proteins and silver nanoparticles (AgNPs) is broad since the anti-inflammatory activity of these specific types of nanoscale clusters is unknown. The objective of this study was to describe the effect of intraperitoneal administration of silver nanoparticles stabilized with collagen and cashew gum in experimental models of paw edema and peritonitis induced by the administration of carrageenan. The potential of inhibition of paw edema of a silver nanoparticle at doses of 1ml / kg, 2ml / kg and 3ml / kg applied intraperitoneally and its action on the enzyme myeloperoxidase activity was analyzed. Oxidative stress and anti-inflammatory activity were also evaluated by the determination of reduced glutathione (GSH), nitrate and nitrite, superoxide dismutase in peritonitis. The results showed that the silver nanoparticle stabilized with collagen and cashew nut at a dose of 3 ml / kg had anti-inflammatory potential by inhibiting the formation of edema by 70% during third hour of experiment. The compound also demonstrated to reduce the activity of the enzyme myeloperoxidase significantly when compared to the control group. The antioxidant potential of the nanoparticle is demonstrated by the reduction of nitrite levels and maintenance of GSH and SOD levels when compared to the carrageenan group. It is concluded that the silver nanoparticle stabilized with collagen and cashew gum has an anti-inflammatory potential, through the inhibition of paw edema and neutrophil migration and antioxidant potential through the maintenance of GSH and SOD levels and decrease of Nitrite levels.

**Keywords:** Silver Nanoparticles. Anti-inflammatory. Anti-oxidant. Oxidative stress. Inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

AgNP – Nanopartículas de prata

NP – Nanopartículas

GSH – Glutathione

SOD – Superóxido Dismutase

MDA – Malondialdeído

NO – Óxido Nítrico

MPO – Mieloperoxidase

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

IL-1 – Interleucina-1

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

PGE2 – Prostaglandina E2

AINES – Anti-inflamatórios Não Esteroidais

COX – Ciclooxygenase

AgNPcol – Nanopartícula de prata e colágeno

Dx – Dextrana

Cg – Carragenina

Hist – Histamina

5-HT – Serotonina

BK – Bradicinina

GPx – Glutathione peroxidase

GSSG – Glutathione oxidada

NOS – Óxido nítrico sintase

AgNPcol – Nanopartículas de prata estabilizadas com colágeno

AgNPcol+pc – Nanopartículas de prata estabilizadas com colágeno e polissacarídeo do cajueiro

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 – Característica dos processos inflamatórios agudo e crônico. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 2 – Grupos da avaliação da curva dose resposta no edema de pata induzida por carragenina.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 3 – Grupos comparação AgNPcol+pc com seus componentes isolados, AgNPcol, Colágeno e Polissacarídeo do cajueiro, no edema de pata induzido por carragenina. ....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 4 – Grupos utilizados durante a peritonite induzida por carragenina ....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Delineamento experimental do estudo.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 2 - Avaliação do edema de pata no pletismômetro .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 3 - Edema agudo de pata induzido por carragenina.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 4 – Edema de pata induzido por carragenina .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 5 - Efeito da administração intraperitoneal de AgNPcol+caju na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 6 - Efeito da administração intraperitoneal de AgNPcol+caju e seus componentes isolados na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 7 - Avaliação da ação da AgNPcol+caju no estresse oxidativo através da avaliação de nitrito no modelo de peritonite induzida por carragenina.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 8 - Efeito da AgNPcol+caju na atividade da Glutathione (GSH) na peritonite induzida por carragenina. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 9 - Efeito da AgNPcol+caju na atividade da Super Óxido Dismutase (SOD) na peritonite induzida por carragenina .....</b>	<b>48</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Nanopartículas .....</b>	<b>15</b>
2.1.1. Nanopartículas de prata .....	18
2.1.2. Colágeno .....	19
2.1.3. Goma do Cajueiro .....	21
<b>2.2. Inflamação .....</b>	<b>23</b>
2.2.1. Inflamação aguda .....	25
2.2.2. Fase vascular .....	25
2.2.3. Fase celular .....	27
2.2.4. Estresse oxidativo .....	29
2.2.5. Fármacos antiinflamatórios .....	31
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos .....	33
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>34</b>
4.1. Animais .....	34
4.2. Preparação da Nanopartícula de prata, colágeno e goma do caju .....	34
4.3. Delineamento Experimental .....	35
4.4. Indução de edema de pata por carragenina .....	36
4.5. Avaliação do edema de pata .....	37
4.6. Avaliação da ação da mieloperoxidase no edema de pata induzido por carragenina.....	38
4.7. Modelo de peritonite induzida por carragenina.....	39
4.8. Dosagem de glutathione (GSH).....	39
4.9. Dosagem de Nitrato .....	40
4.10. Dosagem de Superóxido Dismutase.....	40
4.11. Análise estatística.....	40
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1. Edema de pata induzido por carragenina .....	42
5.2. Atividade de Mieloperoxidase (MPO) .....	43
5.3. Nitrito.....	45
5.4. GSH .....	47

5.5. SOD .....	48
6. DISCUSSÃO .....	49
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas (NP) podem ser produzidas em laboratório, tornando possível controlar tamanho e forma, gerando modificações nas capacidades químicas e físicas do material usado para a síntese quando comparado à sua escala nanométrica. Devido a seu pequeno tamanho, as NPs possuem uma área superficial, por unidade de volume ou massa muito superior a um aglomerado metálico, fazendo com que suas propriedades físico-químicas sejam extremamente dependentes de suas morfologias e tamanhos. Portanto, nanoestruturas são partículas pequenas que apresentam propriedades novas ou melhoradas, como tamanho, distribuição, fase, morfologia, cristalinidade, dentre outros que permitem que as NP sejam atualmente utilizadas em diversos campos na área médica para estudos antimicrobianos, anti-inflamatórios, diagnóstico, entrega de medicamentos e sequenciamento de DNA (DAS et al., 2017; DANIEL E ASTRUC, 2004; ALLAHVERDIYEV, et al., 2011; WIESENTHAL, et al., 2011).

Nesse contexto, as NP metálicas vêm sendo foco de estudos, como por exemplo, prata e ouro. A prata vem sendo utilizada por apresentar uma ampla variedade de aplicações, como por exemplo o controle de infecções, sendo portanto um dos principais metais de escolha para produção de nanopartículas, esse metal é comprovadamente efetivo e aplicado em diversas áreas médicas, devido sua eficiência contra bactérias, vírus e outros microorganismos eucariotos, sem no entanto ser tóxica para humanos, mostrando ainda capacidades anti-angiogênicas, anti-oxidantes e anti-inflamatórias (DAS et al., 2017; MOLDOVAN et al. 2017; CUMBERLAND, LEAD; 2009).

As NP são termodinamicamente instáveis e tendem a se agregar, portanto há a necessidade do uso de estabilizantes pois eles se adsorvem à superfície das NP impedindo sua agregação e mantendo seu tamanho pequeno, preservando suas características (KAMAT, 2002; NICEWARNER-PEÑA, et al., 2001; DICK, et al., 2002; SIGNORI, et al., 2010). Na síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) são comumente utilizados agentes químicos (agentes redutores) para levar os íons metálicos ao seu estado de oxidação zero, através da redução desses íons. (GULRAJANI et al, 2007; DURAN et al, 2010).

Diversos estudos mostram que as nanopartículas de prata possuem efeitos inibitórios consideráveis contra microorganismos, propriedades que ajudam na

cicatrização de feridas e efeitos antitumorais, antibacterianos, antivirais e antiangiogênicos (MURPHY, 2008; MATHEW e KURIAKOSE, 2013; WONG, et al., 2009; BANERJEE e NARENDHIRAKANNAN, 2011; RUTBERG, et al., 2008). A literatura mostra que essas nanoestruturas de prata induzem a apoptose e reduzem o nível de matriz metaloproteínase em feridas, inibe angiogênese e permeabilidade vascular através fator de crescimento do endotélio vascular e interleucina 1 $\beta$  em células bovinas endoteliais (RUTBERG, et al., 2008; RIGO, et al., 2013; KALISHWARALAL, et al., 2010).

Entretanto os efeitos das nanopartículas de prata no processo inflamatório agudo ainda não está bem descrito. Devido à vasta quantidade de fatores decorrentes da inflamação, é importante encontrar tratamentos efetivos com mínimos ou nenhum efeito colateral. Desse modo, a administração de nanopartículas como critério de tratamento, é uma forma de trazer benefícios ao amenizar danos orgânicos ou melhorar o carreamento farmacológico, esses efeitos, porém são pouco estudados na literatura ou deveras desconhecidos, faz-se necessário estudos sobre a eficácia da administração de nanopartículas no processo inflamatório induzido em roedores.

Embora uma quantidade significativa de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios estejam disponíveis para o tratamento da dor e inflamação, essas drogas exercem uma gama de efeitos colaterais, desse modo há uma busca contínua de novos compostos como alternativas terapêuticas. Dessa forma, os produtos advindos de fontes naturais também têm sido uma das fontes para a descoberta de agentes terapêuticos beneficiando aqueles afligidos por quadros inflamatórios (SILVA, 2014).

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Nanopartículas**

O termo nanopartícula não possui uma única definição, dessa forma são normalmente definidas como partículas com dimensão na faixa nanométrica entre 1 e 100nm, porém a *Food and Drug Administration* (FDA) diz que nanopartículas são estruturas que apresentam fenômenos ou propriedades, sejam elas físicas ou químicas ou efeitos biológicos, que podem ser associados à sua dimensão, mesmo

que estas estejam foram da faixa nanométrica (1-100nm), até 1 $\mu$ m (PEREZ et al, 2005).

Atualmente, o foco das investigações na área de nanotecnologia é a síntese controlada de nanopartículas, com diferentes tamanhos, distribuição, forma, pureza, quantidade, qualidade e composição química dessas NPs. Seus efeitos dependem de suas propriedades, principalmente do tamanho, dessa forma o controle da dispersão dessas nanoestruturas é extremamente necessário para a manutenção das suas aplicações com benefício ao ser humano, ja que a literatura mostra ainda que a dispersão e a forma das NPs influenciam nos seus efeitos, principalmente o efeito de toxicidade contra bactérias, especialmente se houver agragação das mesmas com o passar do tempo (FABREGA et al, 2009).

Há diversos métodos de síntese de nanopartículas, sendo divididos em métodos físicos e métodos químicos. Os métodos físicos são chamados *Top Down* (de cima para baixo na tradução para o português), nesses métodos são utilizados métodos físicos para a produção de NPs, como têmpera, moagem e a fotolitografia, a decomposição térmica, a irradiação, a difusão, dentre outros métodos. Esse método então utiliza materiais à granel, e então por intermedio dos processos físicos supracitados, reduz esses materiais à nanopartículas. Os métodos químicos são chamados de *Bottom Up* (no português, de baixo para cima), e envolvem espécies moleculares em reações químicas para gerar o crescimento dos aglomerados, utilizando síntese eletroquímica ou elementos biológicos. A preparação de nanopartículas por esse método envolve a construção das mesmas a partir de átomos ou moléculas individuais (HORISKOSHI; SERPONE, 2013).

Devido às características que essas nanoestruturas possuem, elas tem ganhado grande destaque devido suas diversas aplicações, sendo bastante utilizadas em tecnologia de sensores, aparelhos opticos, marcadores biológicos, sistemas de transporte de drogas, armazenamento de informação e na área de catálise, ganhando portanto bastante evidência nas indústrias têxteis, cosméticas, eletrônicas, ópticas, biomedicas, de agricultura, de engenharia e farmacêuticas (JUNAM, LEAD, 2008; DANIEL E ASTRUC, 2004; KAMAT, 2002; NICEWARNER-PEÑA, et al., 2001; DICK, et al., 2002; ALLAHVERDIYEV, et al., 2011; WIESENTHAL, et al., 2011).

As nanopartículas vem conquistando seu espaço ao mostrar sua função auxiliar no carreamento de fármacos no organismo. De forma a elucidar-se no

estudo de Berce et al. em 2016, onde relata que os recentes avanços em nanotecnologia trouxeram nos últimos anos, várias opções que podem ser usados na clínica, utilizando novas formulações para a entrega de droga citostática, imunoterapia em nanoescala, a detecção de doenças, e diagnóstico molecular. Dentre os tipos de nanopartículas, as nanopartículas metálicas especificamente de prata e ouro tem se destacado por suas promissoras aplicações nas áreas de catálise e biossensores (HADMA, 2009). As AgNPs se destacam por suas propriedades antimicrobianas as quais lhes conferem potencial para várias aplicações biotecnológicas aliadas as suas características elétricas térmicas magnéticas e catalíticas. (WANG, 2011).

Uma exemplificação da utilização de nanopartículas, é citada, ainda, no estudo de Berce et al. em 2016, onde traz, que o progresso na nanotecnologia trouxe o conhecimento de novas formas de tratamento de câncer. Como o principal objetivo é a utilização do sistema de entrega de droga em nanoescala, a fim de melhorar o índice terapêutico de um paciente diagnosticado com câncer, isto pode ser conseguido através do aumento da concentração de um fármaco anticancerígeno no tumor, reduzindo a sua toxicidade sistêmica.

Algumas nanopartículas possuem características únicas, que incluem auto-montagem ou a capacidade de fazer uso dos efeitos de permeabilidade, aumentar a biodisponibilidade de um agente ativo e mudá-lo a partir de um composto com um baixo valor terapêutico em um medicamento altamente eficiente. Como já comprovado antes, as nanopartículas de ouro podem aumentar com sucesso a eficácia de várias drogas anticâncer *in vitro*. Essas nanoestruturas podem ser concebidas para transportar cargas úteis, no organismo, além disso, as estruturas recentemente formadas são capazes de detectar rapidamente células cancerosas, carregar várias substâncias ativas anticancer na sua superfície, e entregar as drogas para a célula rapidamente (SIMON, 2015 e BERCE et al., 2016).

No estudo de DAS e colaboradores em 2017 eles verificaram o potencial anti-inflamatório de uma nanopartícula de prata sobre um edema de pata induzido por carragenina em ratos, aplicando a nanopartícula de forma intraperitoneal, e mostraram que a AgNP produzida por eles com extrato de planta apresentou uma capacidade anti-inflamatória importante ao inibir a formação do edema quando comparados ao grupo que não teve tratamento. Estudos ainda mostram que além de capacidade anti-inflamatória, as AgNPs também possuem uma capacidade

antioxidante ao preservar níveis de glutathiona (GSH) e da enzima superóxido dismutase (SOD) não deixando que os níveis de malondialdeído (MDA) se elevem (EL-RAFIE e HAMED, 2014; RAMACHANDRAN e NAIR, 2011).

### **2.1.1. Nanopartículas de prata**

Dentre a variada gama de materiais para a síntese de nanopartículas, as NPs metálicas vem sendo bastante estudadas, devido suas propriedades funcionais, grande estabilidade térmica, física e química, além de uma funcionalização versátil de sua superfície. As AgNPs são as nanopartículas metálicas mais utilizadas devido suas diversas aplicações e por isso são o foco dessa dissertação (LOPES, 2017; YOU, et al., 2012; HUANG, et al., 2011; GANGWAL, et al., 2011).

A prata foi um dos primeiros metais a serem manipulados e utilizados pelo homem, por ser encontrado na natureza como elemento puro. É um metal de transição que possui cor prateada, é brilhante, maleável e apresenta grande condutividade elétrica. Todos os sais de prata são insolúveis, com exceção de poucos, dentre eles o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). O emprego da prata na medicina se deve à capacidade antibacteriana e antifúngica dos íons  $\text{Ag}^+$  que age diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo ação bactericida imediata e ação bacteriostática residual. A utilização desses íons é vantajosa pois geralmente não apresenta efeitos adversos para os seres humanos, de fato o uso de prata como medicamento era bastante utilizado até a introdução dos antibióticos nas práticas médicas, porém com o aumento dos casos de resistência aos antibióticos, os compostos de prata tem ganhado espaço (SOUZA, et al., 2013).

A redução química é o método mais comumente empregado na produção de nanopartículas de prata (AgNPs), nesse método ocorre a redução dos cátions metálicos para a sua forma elementar, na presença de alguns agentes redutores, como por exemplo, o borohidreto de sódio. O método químico visa a obtenção de uma solução coloidal estável em água e solventes, a redução desses íons de prata promove a formação de átomos de prata, seguido pela aglomeração de partículas que em solução aquosa comumente produz prata coloidal (MELO, 2015).

Outro agente necessário para essa síntese é o agente estabilizante, que pode ser o próprio agente redutor, ou outros compostos químicos como ácidos húmicos, polissacarídeos ou proteínas. (CARVALHO, 2013). A estabilização da AgNP durante sua síntese ocorre de duas maneiras, há a estabilização eletrostática que ocorre pela adsorção de íons pela superfície metálica provocando uma força de

repulsão Cuolômbica entre partículas individuais. E há a estabilização estérica que ocorre ao envolver o centro metálico com uma camada de material que é estericamente volumoso, promovendo uma barreira que impede a aproximação desses centros, essa estabilização pode ser conseguida por polímeros. Alguns estabilizantes combinam ambos os efeitos, formando a estabilização eletroestérica, como é o caso da goma do cajueiro (AIKEN e FINKE, 1999; PATAKFALVI, et al., 2007).

Na busca por uma menor dispersão de morfologia, novas estruturas, ou o uso de reagentes e rotas mais brandas para o meio ambiente ao sintetizar AgNPs, inúmeros precursores foram utilizados como iodeto de prata, perclorato de prata, tetrafluorborato de prata, hexafluorofosfato de prata, que tinham uma reação inicial rápida, porém perdiam velocidade após os primeiros 10 minutos, e outro precursor utilizado foi o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) que possui uma reação mais lenta, porém constante, o que permitia um melhor controle da morfologia da AgNP (SUN et al, 2003; BARSOTTI et al, 2004; PATAKFALVI, et al., 2004).

A utilização dos métodos químicos para a produção de AgNPs ocorrem através da utilização de solventes tóxicos, como o borohidreto de sódio que podem ser adsorvidos à superfície das AgNPs, podendo também ocorrer a criação de subprodutos perigosos e envolver um alto consumo de energia. Devido a essas desvantagens há a necessidade crescente de desenvolver métodos não tóxicos e não agressivos ao meio ambiente, porém com um rendimento alto e um baixo custo (PACIONI, et al., 2015). Alguns agentes redutores e/ou estabilizadores usados para a produção de AgNPs são bactérias, fungos, extratos vegetais, algas, proteínas (como o colágeno) e gomas naturais como no caso da goma do caju (QUELEMES, et al. 2013).

### **2.1.2. Colágeno**

O termo colágeno deriva da palavra grega que significa cola, é uma proteína fibrosa encontrado em diversas partes do corpo humano como pele, dentes, tendões, intestinos e diversos outros locais, compreendendo cerca de 30% do total de proteínas e 6% do peso total do corpo humano. Sendo considerada a proteína mais abundante do reino animal e desempenhando diversas funções desde o suporte de órgãos até o armazenamento de energia (CARDOSO et al., 2016).

É produzido na forma de pró-colágeno pelos fibroblastos, células musculares lisas e osteoblastos, contudo, uma vez liberado para o meio extracelular, perde parte

de sua estrutura proteica e através da fibrilogênese dá origem a estruturas fibrilares (GOISSIS, 2007).

Existem pelo menos 27 tipos diferentes de colágeno, devido às suas associações de suas cadeias  $\alpha$ , esses tipos são classificados em três grandes grupos, em função das características da organização macromolecular da tripla hélice:

Tipo I – Moléculas menores que 300nm e domínios helicoidais ininterruptos;

Tipo II – Moléculas com comprimento igual ou superior a 300nm com domínios helicoidais ininterruptos;

Tipo III – Moléculas menores que 300nm com domínios helicoidais ininterruptos ou não (GOISSIS, 2007).

O colágeno utilizado nesse trabalho foi o tipo I, encontrado principalmente em pele, tendão, ossos e córnea. O colágeno tipo I é formado por três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição um triplete Gly-X-Y, onde X é geralmente uma prolina e Y uma Hidroxiprolina, com uma concentração de cerca de 33%, 12% e 11% respectivamente para os aminoácidos citados anteriormente. A organização do colágeno é pentafibrilar, formado por cinco moléculas de tropocolágeno justapostas ao longo de um eixo longitudinal e deslocadas umas das outras em cerca de  $\frac{1}{4}$  do seu comprimento (GOISSIS, 2007).

O crescente interesse pelo colágeno se dá pelo fato de suas propriedades, como baixa alergenicidade, baixa antigenicidade, e alta biocompatibilidade, ele ainda é bioabsorvível, hemostático, biodegradável e não-tóxico, é sinérgico com componentes bioativos, e compatível com polímeros sintéticos e naturais, possui ainda grande força de tensão e alta afinidade pela água (CARDOSO et al, 2016).

O colágeno tipo I, foi utilizado em dois estudos, Alarcon et al. 2012 e Cardoso et al. 2016, para estabilizar os AgNPs começando com uma solução de nitrato de prata. Os autores conduziram um estudo para testar a biocompatibilidade e as propriedades antibacterianas de AgNPs estabilizadas com colagénio. Reforçando assim, que testes envolvendo os diferentes tipos de colágeno são extremamente importantes para diferenciar, entre suas estruturas e propriedades, os benefícios de nanoprtículas AgNPs em aplicações terapêuticas tais como sistemas de liberação de fármacos, fatores de crescimento, sistemas de ancoragem de formação de células e reparação tecidual. (CARDOSO et al. 2016).

### 2.1.3. Goma do Cajueiro

Como já foi relatado as nanopartículas metálicas livres ou imóveis, apresentam várias propriedades, dentre elas capacidades antiinflamatória e de combater microorganismos, além disso a literatura mostra que essas nanoestruturas metálicas podem ser sintetizadas por biorredução realizada por compostos encontrados em vegetais (TYAGI, 2016). Nesse sentido a planta *Anacardium Occidentale L.* conhecido também como cajueiro produz polissacarídeos que podem ser utilizados para a obtenção de nanopartículas aplicáveis na área médica, principalmente por conta de suas características como propriedades físico-químicas, baixo custo, disponibilidade e características biodegradáveis (MAIA-SILVA, et al., 2012).

O cajueiro faz pertence à família *Anacardiaceae*, fazendo parte dos Dicotyledoneae, de gênero *Anacardium*, espécie *Anacardium Occidentale, L.* (cajueiro comum) (HERBARIO, 2006). O cajueiro é uma árvore comum em pequenos pomares, nas cidades e também muito cultivada em quase todo o país. O seu fruto verdadeiro é a castanha, um fruto seco muito apreciado no Brasil e no exterior (MAIA-SILVA, et al., 2012).

O cajueiro é dotado de diversas propriedades biológicas, destacando-se, antiinflamatórias, anti-oxidantes, antimicrobiana e cicatrizante (FREITAS et al., 2016). Essa árvore, portanto, possui diversas aplicações medicinais, o suco é usado para o tratamento contra a gripe e contra a febre, o chá da casca é utilizado contra a diarreia ou cólicas, o fruto é utilizado contra sífilis e também como diurético. O chá das folhas é empregado nos banhos da boca, em úlceras, amidalite e limpezas de feridas, as folhas e a casca é utilizado em psoríase, eczemas, escrófulas, dispepsias, doenças venéreas, problemas genitais e até na incapacidade sexual (TAYLOR, 2005). Porém existe ainda potencial para o uso da goma do cajueiro, pois essa apresenta potencial antibacteriano, fungicida, antiinflamatório e gastroprotetor (ANDRADE, et al., 2013).

Polímeros naturais têm sido o objeto de estudo de diversos pesquisadores devido ao seu grande campo de aplicações, principalmente como substituto de polímeros sintéticos, com vantagens como baixo custo, baixa toxicidade, boa disponibilidade e biodegradabilidade. Esses biopolímeros têm várias fontes, tais como, semente de algas, exsudatos de plantas e microorganismos (PAULA, et al., 2011). Esses biopolímeros quando tem alta massa molecular formados por unidades

repetitivas denominadas monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas podem ser quimicamente definidos como polissacarídeos (SILVA, 2013).

As gomas são polissacarídeos produzidos pelas células epiteliais das plantas quando o cortéx é agredido por injúrias físicas ou ataque microbiano. A produção do exsudato gomoso é um mecanismo de defesa dessas plantas que crescem em áreas semi-áridas. A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo complexo exsudado de cajueiros (*Anacardium Occidentale*) e por sua semelhança estrutural com a goma arábica têm sido sugerida como sua substituta, além dessa vantagem, existem outras para essa substituição, como a alta biodisponibilidade da goma do cajueiro na região nordeste do Brasil, e também a semelhança química entre as gomas (ANDRADE, et al., 2013).

Outras vantagens da utilização de polissacarídeos como a goma do cajueiro é o seu reconhecimento molecular natural, uma vez que possuem características que dão mais especificidade ao composto, podendo potencializar a farmacocinética da droga. Esses sistemas poliméricos tem atraído bastante atenção da comunidade científica devido ao seu potencial terapeutico entre eles: manutenção do nível terapeutico do fármaco no sangue, diminuição das reações adversas e a melhora do esquema posológico através da diminuição do número de doses, levando à maior aceitação e colaboração do paciente (MOURA, 2009).

As gomas são polissacarídeos naturais, dispostas em arranjos lineares ou ramificados e pertencentes à classe dos carboidratos. São substâncias translúcidas, inodoras, insípidas, não tóxicas, hidrofílicas, amorfas, solúveis em água que em baixas concentrações formam soluções viscosas, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e aglutinantes. Apresentam ainda capacidade de controle de cristalização, inibição de sinérese, encapsulação e formação de filmes, são, portanto, empregadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica como espessantes e estabilizantes, entre outras aplicações. O polissacarídeo ou goma extraído do cajueiro (*Anacardium Ocidentale L.*) é um produto natural e de fácil extração, sendo uma árvore abundante no nordeste do Brasil (MOURA, 2009; ANDRADE, et al., 2013).

A goma do cajueiro é um heteropolissacarídeo não-tóxico e complexo que escorre naturalmente ou ao fazer incisões no tronco da árvore, tem a aparência de uma resina amarelada e contém b-D-galactose, a-D-glicose, arabinose, rhamnose e ácido glicurônico, servindo como um importante redutor e estabilizador da prata.

Apesar do grande potencial estabilizador desse polímero, ele mostrou ainda ter uma certa capacidade redutora, ao reduzir íons  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$ . A preparação de NPs com biopolímeros naturais apresentam diversas vantagens sobre a preparação com agentes químicos como as longas cadeias macromoleculares que possuem um grande número de grupos hidroxila e podem interagir bem ao formar um complexo com íons de metal, possuem ainda radicais carboxila que podem interagir eletrostaticamente com íons de prata formando complexos como parte da nano estrutura da prata (QUELEMES et al. 2013).

O interesse em realizar pesquisas usando proteínas, polímeros naturais e nanopartículas de prata (AgNPs) é amplo pois a atividade anti-inflamatória desses tipos específicos de agrupamentos em nanoescala é pouco conhecido e dados sobre a atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e adsorção de AgNPs foram mostrados na literatura. Estudando a interação de AgNPs com proteínas e polímeros naturais pode ser valioso para a compreensão da estabilidade dos sistemas de nanopartículas, os efeitos da descoberta em sistemas biológicos e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (CARDOSO et al., 2016).

## **2.2. Inflamação**

O processo inflamatório vem sendo estudado por diversos autores sendo uma resposta de defesa que ocorre após dano celular causado por microorganismos, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas. É uma reação complexa em tecidos que consiste principalmente nas respostas dos vasos sanguíneos e leucócitos. Pode ser aguda ou crônica dependendo da natureza do estímulo ou da efetividade da reação inicial em eliminar o estímulo causados (DIAS et al. 2013; SANTIAGO et al. 2015).

A inflamação é um processo fisiológico de defesa que ocorre em decorrência da ativação de alguns mecanismos que provocam alterações nos componentes humorais e celulares após uma injúria tecidual. A exposição a um patógeno gera uma migração de células circulantes, que são direcionadas pela presença de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. Onde irão atuar então destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma extravasado) e isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos de reparação tecidual (regeneração e cicatrização) (CRUVINEL, et al., 2010).

A resposta inflamatória, apesar de complexa, por fazer parte da imunidade inata, apresenta-se de maneira essencialmente estereotipada, caracterizada basicamente pela reação de vasos sanguíneos, levando ao acúmulo de fluidos e células sanguíneas. Essas reações vão permitir a liberação, ativação ou síntese de substâncias conhecidas como mediadores químicos ou farmacológicos da inflamação, que serão responsáveis por determinar diversas reações locais, tais como dilatação de vasos da microcirculação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, extravasamento de líquido plasmático, formação de edema, diapedese da célula para o meio extravascular, fagocitose, aumento da viscosidade do sangue, diminuição do fluxo sanguíneo, podendo gerar até uma estase. Assim o processo inicial, agudo, se manifesta localmente de forma padronizada e estereotipada, qualquer que seja a natureza do estímulo lesivo (BECHARA e SZABÓ, 2006).

Entretanto a inflamação pode ser potencialmente danosa, já que sua manifestação pode gerar lesões no próprio organismo, às vezes de forma mais deletéria que o próprio agente da injúria, como ocorre na artrite reumatoide do homem e em alguns tipos de pneumonia. Dessa forma a inflamação pode ser dividida em aguda ou crônica, dependendo de algumas características básicas, na tabela 1 podemos observar as diferenças entre a inflamação crônica e aguda.

**Tabela 1** – Característica dos processos inflamatórios agudo e crônico.

	<b>Inflamação aguda</b>	<b>Inflamação crônica</b>
<b>Agente causal</b>	Patógenos orgânicos, radiação ionizante, agentes químicos, trauma mecânico	Persistência do estímulo inflamatório inicial, autoimunidade
<b>Células envolvidas</b>	Neutrófilos, macrófagos e mastócitos	Monócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos
<b>Mediadores primários</b>	Aminas vasoativas, eicosanoides, espécies reativas de oxigênio	Interferon – $\gamma$ , citocinas, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas
<b>Início</b>	Imediato	Tardio
<b>Duração</b>	Poucos dias	Meses ou anos
<b>Evolução</b>	Cicatrização com restituição <i>ad integrum</i> , formação de abscesso ou cronificação	Destruição tecidual e fibrose

Fonte: Cruvinel et al., 2010.

### **2.2.1. Inflamação aguda**

A inflamação aguda apresenta cinco sinais clínicos, conhecidos como cinco sinais cardinais da inflamação, são eles: rubor (vermelhidão), tumor (edema), calor, dor e perda de função. Esse tipo de inflamação possui três componentes principais: Alterações no calibre vascular que geram um aumento do fluxo sanguíneo, mudanças estruturais na microvasculatura que permitem que as proteínas do plasma e os leucócitos saiam da circulação e emigração de leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco da injúria e sua ativação para eliminar o agente agressor (SERHAN, 2004; DIAS et al., 2013).

Durante a inflamação vários sistemas bioquímicos, como cascata do sistema complemento, do sistema de cininas e da coagulação, são ativados, auxiliando no estabelecimento, evolução e resolução do processo. Adicionalmente, substâncias solúveis e de meia-vida curta são liberadas, exercem sua ação e são degradadas. Em geral, o sucesso na remoção do estímulo desencadeador leva ao término da resposta aguda e ao reparo tecidual completo (CRUVINEL, et al., 2010).

A inflamação aguda é então dividida em duas importantes fases: a fase vascular mediado pela liberação de histamina e serotonina, seguidas de bradicinina e prostaglandinas e a fase celular caracterizada pela produção de citocinas, liberação de macrófagos e mastócitos, além de um intenso infiltrado neutrofílico (SERHAN, 2004; DIAS et al. 2013).

### **2.2.2. Fase vascular**

Na fase vascular, há alterações que ocorrem nos vasos sanguíneos da microcirculação nas primeiras horas após a injúria, em graus variados há três tipos de processos:

- I- Modificação no calibre dos vasos e fluxo sanguíneo;
- II- Aumento da permeabilidade vascular;
- III- Exsudação de plasma e de células para o meio extravascular que são destinadas a maximizar o movimento de proteínas plasmáticas para fora da circulação, formando o exsudato (fluido extravascular com alta concentração de proteína) indicando aumento da permeabilidade normal na área da lesão (CRUVINEL et al., 2010).

A modificação no calibre dos vasos e fluxo sanguíneo começa a partir da vasodilatação, que primeiro envolve as arteríolas e então leva à abertura de novos leitos capilares na área, aumentando o fluxo sanguíneo (o que causa calor e rubor,

dois dos cinco sinais cardinais da inflamação de Celsus), induzida principalmente por histamina, óxido nítrico (NO), bradicinina, serotonina e prostaglandinas, isso pode gerar um aumento da pressão hidrostática local, suficiente para causar uma transudação de fluido rico em proteínas para o espaço extravascular (BECHARA e SZABÓ, 2006).

A consequência dessa transudação é uma redução na velocidade fluxo sanguíneo, devido ao aumento da viscosidade sanguínea pela retirada de fluidos e proteínas e pela elevação da concentração de eritrócitos em vasos pequenos, dilatando os mesmos e aumentando a permeabilidade vascular, esse processo é conhecido como estase ou congestão vascular, com essa diminuição de velocidade no fluxo sanguíneo há uma tendência dos leucócitos se encontrarem de forma mais periférica no vaso sanguíneo, principalmente os neutrófilos, processo denominado marginação, isso permite que se acumulem no local da lesão, se aderindo à parede do vaso através das moléculas de adesão que estão mais expressas nas células endoteliais devido a mediadores produzidos no local da lesão e migrando para o tecido intersticial se dirigindo ao local da lesão (DIAS et al. 2013).

O aumento da permeabilidade vascular é uma das consequências principais da inflamação aguda, mediado principalmente por mediadores do tipo da histamina e bradicinina, que causam uma abertura transiente das junções entre as células endoteliais adjacentes formando lacunas de 0,1 – 0,4 µm de largura, levando à saída de exsudato gerando edema, esse mecanismo é chamado também de resposta transitória imediata pois ocorre rapidamente em resposta ao mediador e é usualmente de curta duração (BECHARA e SZABÓ, 2006).

A formação de lacunas parece ser mediada pela ativação de proteínas contráteis presentes nas células endoteliais, levando a uma separação das células a partir de suas junções, conhecido como “*gaps*”, esse evento ocorre primariamente nas vênulas. A contração das células endoteliais das vênulas se dá pela ação de mediadores químicos, pois essas células possuem, em maior concentração, receptores para mediadores químicos da inflamação (BECHARA e SZABÓ, 2006).

No caso da formação fisiológica dessas lacunas, não há evidência de lesão concomitante do citoplasma das células endoteliais, e quando o vazamento cessa, as células se aproximam novamente para refazer uma junção morfolologicamente normal. No entanto, quando há o acúmulo de neutrófilos e estes se aderem ao endotélio durante a inflamação também podem causar danos às células endoteliais,

amplificando a reação inflamatória e aumentando o extravasamento, que pode ser mantido por horas após a lesão até que o vaso seja reparado ou trombosado (BECHARA e SZABÓ, 2006).

### **2.2.3. Fase celular**

A inflamação tem como função crítica a entrega de leucócitos para o local da lesão visando a eliminação do agente agressor e a resolução da injúria, isso ocorre durante a segunda fase da inflamação aguda, a fase celular, onde a migração que ocorre é principalmente de neutrófilos e macrófagos. Os leucócitos incorporam e degradam bactérias, complexos imunes e restos de células necróticas, e suas enzimas lisossomais contribuem de outras formas com a resposta defensiva do hospedeiro. Entretanto, leucócitos podem também prolongar a inflamação e aumentar o dano tecidual pela liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais livres, que são tóxicos para os tecidos (MÓCSAI, 2015).

A entrega de leucócitos envolve três processos principais:

- I- Marginação;
- II- Rolamento e adesão;
- III- Migração e quimiotaxia (MÓCSAI, 2015).

No fluxo sanguíneo normalmente as hemácias estão presentes na luz do vaso, empurrando os leucócitos para a parede do vaso, com a lentificação do fluxo sanguíneo e dilatação dos vasos presentes no local da inflamação, as condições hemodinâmicas mudam fazendo com que seja possível que as hemácias se aglomerem, de forma a empilhar-se, o fenômeno do empilhamento, ou *rouleaux*, esses aglomerados de glóbulos vermelhos fazem com que os leucócitos assumam condições periféricas, processo esse chamado de marginação (MCEVER, 1991; PARKIN; COHEN, 2001).

Seguindo esse processo, os leucócitos se ligam transitoriamente à parede do vaso e se desligam sucessivamente através de ligação de moléculas chamadas selectinas, que possuem uma afinidade baixa, fazendo com que a força de arraste presente no fluxo sanguíneo quebre as ligações e desloque a célula, que se liga mais à frente novamente, rolando pela parede do vaso até chegar no local da inflamação, o processo de rolamento mediado pelas selectinas e a diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo (diminuindo sua força de arraste) da oportunidade aos leucócitos de se aderirem mais firmemente ao endotélio através da ligação com moléculas de adesão chamadas de integrinas. A expressão superficial dessas

moléculas é induzida, aumentada ou alterada por mediadores inflamatórios e mediadores químicos, tais como: endotoxinas, C5a, peptídeos quimiotáticos, leucotrieno, IL-1, TNF, dentre outros, resultando em adesividade aumentada. Alguns desses agentes atuam sobre os leucócitos, outros sobre as células endoteliais e outros em ambos (MCEVER, 1991; PARKIN; COHEN, 2001).

Após essa adesão, ocorre a migração dos leucócitos, que se refere ao processo pelo qual estas células escapam dos vasos sanguíneos para o local da inflamação. Depois da adesão os leucócitos movem-se ligeiramente ao longo da superfície endotelial e inserem pseudópodos nas junções interendoteliais. Eles deslizam por essas junções alargadas, para assumir posição, eventualmente, enter a membrana basal e a célula endotelial. Aí podem permanecer por curto período de tempo, mas atravessam depois a membrana basal e escapam para o espaço extravascular (BECHARA e SZABÓ, 2006). Através dessa transmigração ou diapedese, as quimiocinas produzidas no local da lesão estimulam as moléculas aderidas a migrarem para o interstício em direção ao gradiente de concentração químico se acumulando no local da lesão onde serão ativados para resolver a inflamação (MCEVER, 1991; PARKIN; COHEN, 2001).

O acúmulo de leucócitos no local da lesão, no entanto, depende da liberação ou ativação de mediadores químicos com atividade quimiotática sobre essas células. Essas substâncias determinam a migração direcionada de leucócitos segundo um gradiente de concentração, razão pela qual a quimiotaxia é definida como a migração unidirecional de células. Existem diversos agentes quimiotáticos, dentre eles as citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a síntese de moléculas de adesão de superfície que estimulam a adesão ao endotélio de neutrófilos, monócitos e linfócitos, também estimulam a síntese de fator de agregação plaquetária (outro agente quimiotático) e proliferação fibroblástica (BECHARA e SZABÓ, 2006).

O tipo celular presente em uma reação inflamatória varia em número com a idade da lesão e com a natureza do estímulo. Assim na maioria dos tipos de inflamação aguda, predominam os neutrófilos nas primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídos por linfócitos e células derivadas de monócitos em 24 a 48 horas. Os neutrófilos então após acumular-se no sítio inflamatório serão então ativados e farão a fagocitose dos microorganismos e partículas estranhas como modo de resolver o processo inflamatório (BECHARA e SZABÓ, 2006).

Os neutrófilos são células polimorfonucleares que constituem a primeira linha de defesa contra uma grande quantidade de ameaças, incluindo bactérias, vírus, protozoários e fungos. O citoplasma dos neutrófilos apresentam três tipos de granulações: os grânulos primários ou azurófilos, os grânulos secundários e os terciários. Os grânulos primários contêm grandes quantidades de mieloperoxidase (MPO), uma enzima responsável por produzir o ácido hipocloroso (HOCl), uma espécie reativa de oxigênio com grande poder antimicrobiano (MAJNO, 2004).

No entanto, os leucócitos quando ativados podem induzir dano tecidual ao liberar a MPO, essa enzima possui como substrato o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), este na presença de íons cloreto, catalisa a conversão do  $H_2O_2$  em uma espécie mais reativa que o  $O_2^{\cdot-}$ , o HOCl, um potente agente antimicrobiano que exerce sua atividade através da peroxidação lipídica, podendo induzir portanto danos às células adjacentes e contribuir assim com a patogênese da inflamação, prolongando a inflamação, essa quando extensiva ou não regulada é altamente danosa ao organismo. Muitas doenças envolvem inflamação com dano tecidual como ocorre na esclerose múltipla, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, lesão do cérebro e medula espinal e acidente vascular encefálico (LIMA et al., 2007).

#### **2.2.4. Estresse oxidativo**

Devido aos vários processos que ocorrem no sentido de eliminar o agente agressor, como a libertação de peptídeos antimicrobianos pela desgranulação acidificação do meio, cria-se um ambiente hostil que impede o crescimento microbiológico, e também há a produção de espécies reativas de oxigênio (FLANNAGAN, et al., 2009). Em condições fisiológicas essas espécies são formadas de forma basal, pois são de extrema importância no combate a agentes invasores, no entanto seu excesso está relacionado ao chamado estresse oxidativo que leva à formação de moléculas como o peróxido de hidrogênio, citado anteriormente, bem como de ânion superóxido e peroxinitrito, os quais são produzidos em resposta ao estímulo e podem também exacerbar o processo inflamatório. Esses produtos do estresse oxidativo são formados principalmente pelo infiltrado neutrofílico. Dados mostram que além do complexo MPO- $H_2O_2$ , o peróxido de hidrogênio também pode ser produzido por citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , essa produção pode gerar radicais livres que são a maior causa de dano na inflamação (SILVA et al. 2013).

No contexto da peroxidação lipídica, seu produto final é o malondialdeído (MDA) que reflete o balanço entre os sistemas oxidante e antioxidante. O MDA aumenta devido aos radicais livres induzidos pelo dano à membrana plasmática. Os radicais livres são moléculas liberadas pelo metabolismo corporal, com elétrons altamente instáveis e reativos, que podem causar doenças degenerativas, envelhecimento e morte celular (VASCONCELOS et al., 2017).

Já em 1997, Ferreira em seu estudo dizia que nas últimas décadas, estavam sendo realizados inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos, inclusive na inflamação. Esses radicais estão relacionados ao dano do tecido conjuntivo ocorrido na inflamação, evidências mostram que a produção intracelular de ROS desempenha um papel importante na patogênese da inflamação, promovendo a produção de diversas citocinas incluindo as pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que são responsáveis pela ativação de neutrófilos e migração desses para o local da lesão (SANTIAGO et al. 2015.)

Outra forma de ROS encontrada durante a inflamação é o NO que é um gás produzido a partir da arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase. É liberado por neurônios, células endoteliais, plaquetas e neutrófilos em resposta à um estímulo patológico. Grandes quantidades de NO são produzidas no processo inflamatório gerado principalmente por sua isoforma induzida (iNOS) podendo se tornar tóxica, gerando radicais livres, culminando no nitrito, este por sua vez pode gerar dano oxidativo que causa lesão celular, levando ao aumento da inflamação (SILVA et al. 2017)

Essas substâncias podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (VASCONCELOS et al., 2017).

Uma ampla definição de antioxidante seria qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES, 1995). Sobre condições normais esse estresse oxidativo é controlado pelo sistema antioxidante endógeno enzimático e não-enzimático como a glutathiona reduzida (GSH) e a enzima

superóxido dismutase (SOD). O GSH é um antioxidante não enzimático endógeno que protege as células contra espécies reativas de oxigênio geradas durante injúrias ao exercer seu papel protetor mantendo grupos sulfídricos de proteínas reduzidos e prevenindo que estes reajam com os radicais livres (DIAS et al. 2013). A SOD é o sistema de defesa presente nas células que convertem os ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio, que posteriormente será eliminado junto com outras moléculas através do sistema tioredoxina-peroxiredoxina (XU et al. 2018).

Durante a inflamação o excesso de radicais livres leva ao dano tecidual e à ativação de mediadores inflamatórios, levando ao consumo desses mecanismos de defesa endógenos (SILVA et al. 2013; SANTIAGO et al. 2015). O alvo prioritário do estresse oxidativo a nível celular são a membrana celular (inativação de enzimas e alterações do transporte transmembrana), o citoplasma e seus constituintes (proteínas e lipídios) e, fundamentalmente, o DNA do núcleo das células eucariotas (mutagênese). As doenças cardiovasculares, a carcinogênese e o envelhecimento são exemplos representativos de consequências que decorrem do estresse oxidativo. Dessa forma, a busca por compostos reversores de quadros inflamatórios vem sendo bastante elucidada quando pesquisados na literatura, pois processos pró-inflamatórios são regulados por uma série equivalente de processos anti-inflamatórios teciduais (LIMA et al., 2007).

#### **2.2.5. Fármacos antiinflamatórios**

Mesmo sendo o mecanismo de inflamação e nocicepção indispensáveis à homeostase corpórea, o desconforto causado por essa resposta exige, em alguns casos, a intervenção com o uso de medicamentos. Os glicocorticoides ou antiinflamatórios esteroidais (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), são fármacos capazes de interferir neste processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto (COUTINHO et al, 2009).

Os glicocorticoides são esteroides lipofílicos. Esta classe de medicamentos possui um amplo espectro de indicações terapêuticas, mas o tratamento envolvendo mecanismos de imunomodulação ou de inflamação é a sua principal indicação. No sistema imune, a ação dos AIEs ocorre em diversos pontos, como na modulação da taxa de expressão de fatores de transcrição; ou quando inibem a fosfolipase A2 (LONGUI, 2007).

Os AINEs representam um grupo heterogêneo, em sua maior parte são ácidos orgânicos com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória. Estes medicamentos agem inibindo as enzimas COX, com conseqüente diminuição da produção de prostaglandinas e combate a inflamação, a dor e a febre (HILÁRIO, et al., 2006). Estes medicamentos têm ação eficaz sobre a inflamação, no entanto o uso prolongado destas drogas pode acarretar no aparecimento de efeitos colaterais que chegam a impossibilitar alguns tratamentos.

Na corticoterapia, os efeitos estão relacionados ao tempo de tratamento e uso de glicocorticoides de ação mais prolongada. São implicações em uma variedade de sistemas no organismo; no sistema endócrino-metabólico, imunológico, cardiovascular e muitos outros. Os efeitos colaterais causados pelo uso de AINES é também relacionado aos tratamentos mais longos. O uso crônico destes medicamentos pode acarretar em esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal (LONGUI, 2007; HILÁRIO, et al., 2006).

Atualmente, a principal abordagem terapêutica acontece com o uso destes fármacos; desta forma, a grande incidência de efeitos colaterais por estes medicamentos se torna um estímulo para a procura de novas alternativas terapêuticas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Descrever o efeito da administração intraperitoneal de nanopartículas de prata estabilizadas com colágeno e goma do cajueiro em modelos experimentais de edema de pata e peritonite.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Identificar a concentração ideal de nanopartículas para os modelos experimentais;
- Avaliar o efeito das nanopartículas de prata no edema de pata e na peritonite induzidos por carragenina;
- Averiguar a ação das nanopartículas na migração neutrofílica no edema de pata através da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase;
- Examinar o potencial antioxidante das nanopartículas de prata através da dosagem de glutathione e superóxido dismutase na peritonite;
- Analisar efeito das nanopartículas no estresse oxidativo através da dosagem de nitrito na peritonite.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Camundongos swiss, machos, adultos, pesando entre 25 e 30g serão utilizados neste estudo, fornecidos pelo biotério de manutenção de animais destinados a experimentação do departamento de morfofisiologia veterinária CCA/UFPI.

Após a sua chegada, os camundongos foram mantidos em um ambiente silencioso, com iluminação adequada e temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo fornecidos comida e água suficientes. Para minimizar o seu sofrimento, no ponto apropriado na experiência, após 4 horas da indução da inflamação aguda, seja na pata ou no peritônio, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados por dose letal de uma Injeção intraperitoneal de solução de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) aplicados a 12% do peso. O experimento com animais foi aprovado pelo comitê de ética de experimentação animal da Universidade do Piauí (protocolo nº 295/17).

### 4.2. Preparação da Nanopartícula de prata, colágeno e goma do caju

O preparo das Nanopartículas de prata estabilizada com colágeno tipo I e goma de polissacarídeo do cajueiro (AgNPcol+pc) segue o seguinte procedimento experimental de síntese de nanopartículas de prata estabilizadas com blendas poliméricas, segundo Cardoso et al. em 2017, modificado:

Primeiramente foram preparadas as soluções:

- Nitrato de prata  $\text{AgNO}_3$  1 mM (Mistura de 0,017g para 100ml de água destilada)
- Polímeros naturais 0.3% - Solução de polímero de caju.
- Colágeno Hidrolisado 0.3%
- Solução de Borohidreto de Sódio 0.1 mol/L (Mistura de 0,0189g para 5ml de água destilada)

Após a preparação da solução de colágeno e polímero (goma do caju) se inicia a síntese da blenda polimérica, onde foi feita uma mistura numa razão de 1:1 v/v da solução de colágeno hidrolisado 0,3% e da solução de polímero 0,3% para agitação a 150rpm durante 15 a 20 minutos até a solução ficar homogênea, e as blendas poliméricas são sintetizadas ao fim desse processo.

Finalizada a produção de todas as soluções necessárias à síntese das nanopartículas foi colocado em uma razão 1:1 v/v da blenda polimérica e nitrato de prata 1mM para agitação a 150 rpm por 15 min e protegido da luz. Após esse tempo foi adicionado à mistura a solução de borohidreto de sódio de forma de jato rápido, estando esse levemente gelado, a solução então muda de cor de acordo com a agitação até atingir a cor característica da nanopartícula de prata (cor âmbar), finalizado o processo a solução foi armazenada em vidro escuro ou em outro qualquer desde que esteja protegido da luz (usando papel alumínio). Desse modo a nanopartícula de prata é sintetizada com uma concentração de 50µg/ml.

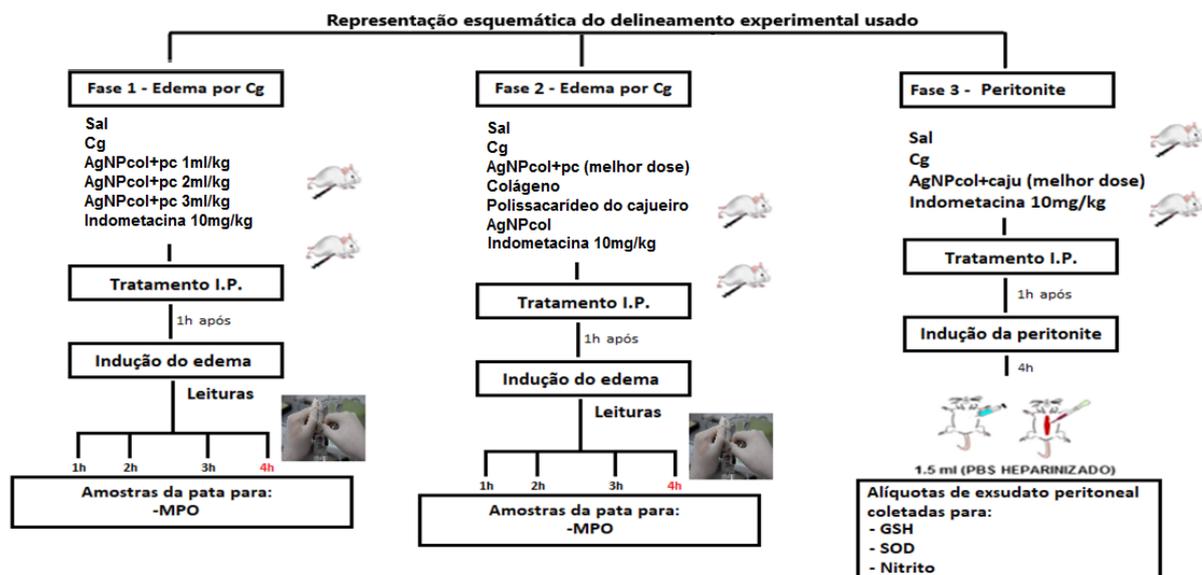
### **4.3. Delineamento Experimental**

O estudo foi conduzido em 2 fases. Primeiramente, foi realizada uma curva dose resposta da nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro (AgNPcol+pc) com análise de edema de pata para identificar a melhor dose com a qual foram conduzidos os outros experimentos. Após a identificação dessas doses, foram feitos grupos com administração de colágeno, goma do cajueiro e Nanopartícula de prata estabilizada somente com colágeno, ao final desses experimentos de edema de pata amostras biológicas do tecido da pata desses animais foram retiradas para análise bioquímica de Mieloperoxidase (MPO). Após a identificação da melhor dose, na segunda fase foi feita uma comparação da atividade anti-inflamatória da nanopartícula com seus componentes isolados no edema de pata induzida por carragenina.

Na terceira fase foi realizada a peritonite induzida por carragenina onde foi aplicada somente a melhor dose da nanopartícula já identificada previamente, dessa peritonite foi retirado o lavado peritoneal para a análise do estresse oxidativo, através das análises dos níveis de nitrito, e da defesa antioxidante através da análise do GSH e da SOD. O delineamento experimental segue como mostrado na figura 1.

A divisão dos grupos nas fases está exemplificada nas tabelas 2 e 3.

**Figura 1 - Delineamento experimental do estudo**



Fonte: Do autor

#### 4.4. Indução de edema de pata por carragenina

A literatura (Moonjit Das et al, 2017) utilizou soluções de AgNP aplicadas de forma intra-peritoneal (1ml/kg para o grupo de tratamento), foi utilizada portanto essa dose como base para a curva dose resposta baseada na literatura, nesse sentido, como a concentração da Nanopartícula é 50 $\mu$ g/ml, as concentrações de doses utilizadas para a curva dose-resposta foram convertidas para 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml e 150 $\mu$ g/ml, correspondendo respectivamente à 1ml/kg, 2ml/kg e 3ml/kg.

Na indução do edema de pata por carragenina, inicialmente, os camundongos foram pré-tratados 1 hora antes com injeção intraperitoneal de nanopartículas em doses já descritas. O edema foi induzido pela administração de 50  $\mu$ l de uma suspensão de carragenina (500  $\mu$ g/pata) na pata traseira direita, a qual foi diluída em açsalina estéril (0,9 %). O volume da pata foi medido antes ( $V_0$ ), e após 1, 2, 3 e 4 horas do tratamento com carragenina ( $V_t$ ), usando um pletismômetro (Panlab,

Barcelona, Espanha) como descrito por CHAVES et al (2013). Após a 4ª hora os animais sofreram eutanásia e amostras da pata foram colhidas para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

Após a análise da inibição do edema de pata, foi escolhida a dose com melhor inibição de edema para continuidade do estudo.

Os animais foram distribuídos em grupos para a curva dose-resposta de acordo com o mostrado na tabela 2. Para a comparação da nanopartícula com seus componentes isolados foram utilizados os grupos conforme a tabela 3.

**Tabela 2** – Grupos da avaliação da curva dose resposta no edema de pata induzida por carragenina

G1: 50µl de solução salina estéril a 0,9%
G2: Agente Flogístico 50 µl de carragenina (500 µg/pata)
G3: Indometacina 10mg/kg
G4: <b>AgNPcol + pc</b> (Dose 1) 50µg/kg
G5: <b>AgNPcol + pc</b> (Dose 2) 100µg /kg
G6: <b>AgNPcol + pc</b> (Dose 3) 150µg/kg

**Tabela 3** – Grupos comparação AgNPcol+pc com seus componentes isolados, AgNPcol, Colágeno e Polissacarídeo do cajueiro, no edema de pata induzido por carragenina.

G1: 50µl de solução salina estéril a 0,9%
G2: Agente Flogístico 50 µl de carragenina (500 µg/pata)
G3: Indometacina 10mg/kg
G4: <b>AgNPcol + pc</b> 150µg/kg
G5: <b>Colágeno</b> 150µg/kg
G6: <b>Polissacarídeo do cajueiro</b> 150µg/kg
G7: <b>AgNPcol</b> 150µg/kg

#### 4.5. Avaliação do edema de pata

O volume das patas foi mensurado através do deslocamento do líquido em um pletismômetro (PanLab LE 7500) antes da injeção do estímulo inflamatório por

carragenina (tempo zero). Após a indução do estímulo inflamatório o volume da pata foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina. Esses tempo de medição foram usados pelo pico do edema induzido pela carragenina se dar na 3ª hora após a injeção. O edema foi cauculado como a variação do volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero). Depois da quarta hora os animais foram eutanásiados.

A avaliação da variação do volume do edema foi calculado como inibição percentual relativa do volume da pata dos controles tratados com salina usando a seguinte fórmula (CHAVES, 2013).

%inibição do edema =  $\frac{(V_t - V_0)_{\text{controle}} - (V_t - V_0)_{\text{tratado}}}{(V_t - V_0)_{\text{controle}}} \times 100$ . Em que  $V_0$  é o volume basal e  $V_t$  é o volume final mensurado nos tempos ja indicados.

**Figura 2** - Avaliação do edema de pata no pletismômetro



Fonte: Do autor

#### **4.6. Avaliação da ação da mieloperoxidase no edema de pata induzido por carragenina**

Foram retiradas as amostras do tecido da pata dos camundongos e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , em microtubos de 1,5ml para posterior dosagem da atividade da MPO no tecido. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos (BRADLEY et al. 1982). O

ensaio da atividade da enzima MPO foi baseado no método de Bradley et al. (1982). Para isso as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com o homogeneizador de tecidos. Posteriormente sendo centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 minutos a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi então colhido. Os níveis teciduais da atividade da MPO foram determinados por meio da técnica de Bradley e Cols (1982) usando 1% de peróxido de hidrogênio e a produção de ânion superóxido, a qual é responsável pela conversão de o-dianisidina a um composto castanho. A alteração da densidade óptica das amostras seguindo a adição de O-dianisidina foi medida pelo espectrofotômetro a 450nm como uma função da reação de tempo. Os resultados serão expressos como unidades de MPO (UMPO)/miligrama de tecido.

#### 4.7. Modelo de peritonite induzida por carragenina

Para indução de peritonite segundo Silva et al. (2013), foi administrada intraperitonealmente nanopartículas de acordo com a melhor dose (150µg/kg) verificada no edema de pata (i.p.). 1 hora depois, a inflamação foi induzida com carragenina (250 µl; 500 µg/cavidade). Os animais foram eutanasiados 4 horas mais tarde e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de PBS heparinizado para a colheita peritoneal de células. Os volumes recuperados foram semelhantes em todos os grupos experimentais e equivalentes a 95% do volume injetado, a amostra coletada de líquido peritoneal foi utilizada para a análise dos níveis de glutathiona (GSH), concentrações de nitrito e nitrato (NO<sub>2</sub>) e concentrações de superóxido dismutase (SOD), os animais serão distribuídos em grupos de acordo com a tabela 3.

**Tabela 4** – Grupos utilizados durante a peritonite induzida por carragenina

G1: Solução salina estéril a 0,9%
G2: Carragenina 250µl/cavidade
G3: Indometacina 10mg/kg
G4: AgNPcol+pc (melhor dose)

#### 4.8. Dosagem de glutathiona (GSH)

O principal mecanismo de defesa antioxidante do corpo é o tripeptídeo de aminoácidos Glutathiona (GSH) e para sua mensuração, as amostras de líquido

peritoneal foram separadas em 5ml de solução de EDTA 0,02 M frio (1mL 100mg/tecido) em um Homogenizer workcenter IKA T10 basic. As alíquotas (400µl) do homogenato do tecido foram misturadas com 320µl de água destilada e 80µl de 50% (w/v) de ácido tricloroacético em tubos de vidro e centrifugadas a 3000rpm durante 15 minutos. Em seguida, 400µl de cada sobrenadante foi misturado com 800µl de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e 20µl de 0,01 M de 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico). Subsequentemente, as amostras foram agitadas durante 3 minutos e lidas num espectrofotômetro à 412nm. A concentração de GSH foi determinada através de uma curva padrão gerada em paralelo e os resultados foram expressos em microgramas de GSH por mililitro de líquido peritoneal (VASCONCELOS, et al. 2017).

#### **4.9. Dosagem de Nitrato**

O método foi baseado na utilização do reagente de Griess que mostra a presença de nitrito na amostra por uma reação de deteriorização que forma um cromóforo de cor rosa. As amostras de líquido peritonetal foram centrifugadas a 10.000rpm por 15 minutos, após isso foi retirado 100µl do sobrenadante e adicionados à isso 100µl de reagente de Greiss para ser analisado no Elisa à 540nm após 10 minutos, os resultados foram expressos em µM de  $\text{NO}_2^-$  por cavidade (SILVA et al. 2017).

#### **4.10. Dosagem de Superóxido Dismutase**

A determinação da atividade da Superóxido dismutase foi realizado pela adição de 100µl de lavado peritoneal a uma solução bruta contendo 20mM de metionina, 75µl de cloreto de hidroxilamina, 50µm de EDTA e 80µl de riboflavina em 1110µl de tampão fosfato. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos. Após 10 minutos de incubação o final da catálise é determinado pela interrupção da luz. O composto formado foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 550nm (MARKUS, et al. 2018).

#### **4.11. Análise estatística**

Nas análises de dados estes foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. Os dados foram analisados estatisticamente por médias através da análise de variância One-way ANOVA com medidas repetidas para comparação entre grupos. O pós-

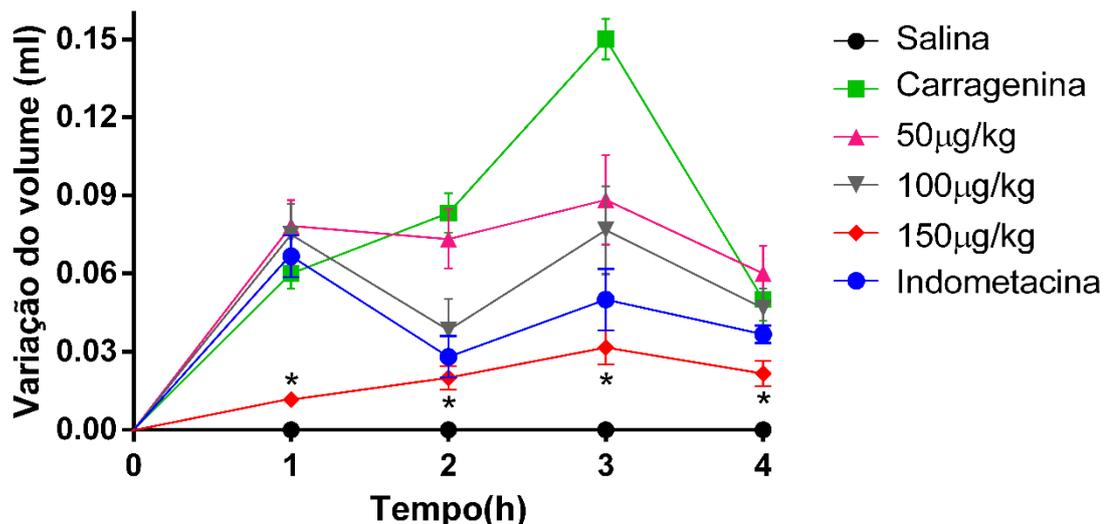
teste de Bonferroni também foi usado. O nível de significância será de 5% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Edema de pata induzido por carragenina

A administração de carragenina aumentou o volume da pata por um intervalo de tempo de aproximadamente 4 horas quando comparado ao grupo salina. A formação do edema se deu rapidamente depois da administração fazendo com que o volume da pata aumentasse consideravelmente nos grupos carragenina, no grupo indometacina, e nos grupos tratados com a nanopartícula nas doses de 50µg/kg e na dose de 100µg/kg, na dose de 150µg/kg o edema formado não teve diferença estatística com o grupo salina. O pico do edema se dá na terceira hora o grupo carragenina apresentou uma variação de volume de  $0,13 \pm 0,009$ ml, apresentando uma diferença estatística quando comparado ao grupo salina, dos grupos tratados somente o grupo com a dose de 150µg/kg apresentou diferença estatística em todas as horas quando comparado ao grupo carragenina, variando  $0,031 \pm 0,006$ ml na terceira hora representando uma redução de 76% do edema em comparação ao grupo carragenina. Além disso, o grupo de 150µg/kg não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo salina em todas as horas avaliadas no experimento. Todos os grupos apresentaram redução do edema na quarta hora.

**Figura 3** - Edema agudo de pata induzido por carragenina

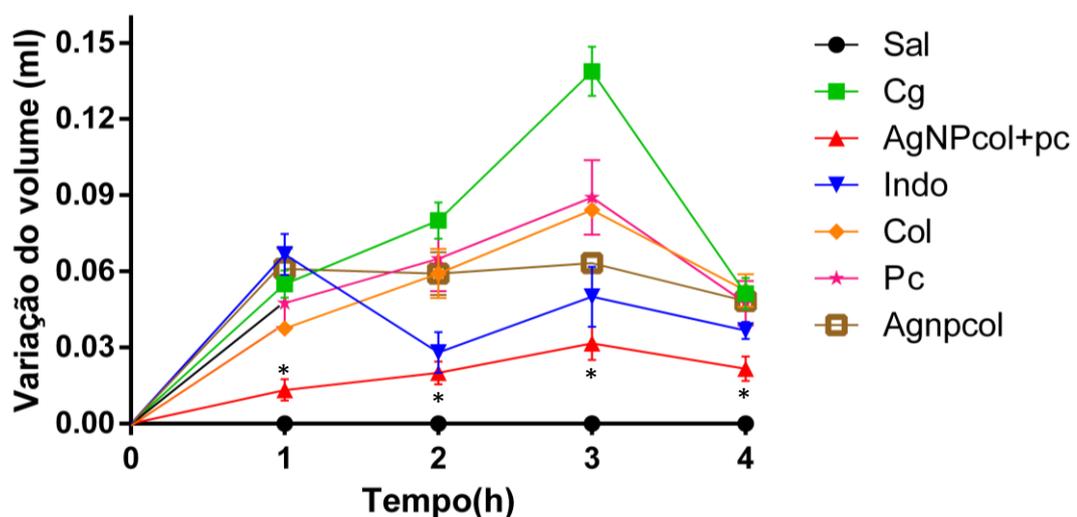


Legenda: O tratamento com AgNPcol+caju foi eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo carragenina. Os resultados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo carragenina.

## 5.2. Comparação da AgNPcol+pc com seus componentes isolados

Na comparação com os componentes isolados, colágeno, polissacarídeo do cajueiro e AgNPcol, pode-se observar que os mesmos tiveram uma inibição do edema de forma estatisticamente significativa quando comparados ao grupo carragenina, tendo inibições de 38%, 38% e 53% respectivamente. A formação do edema se deu rapidamente depois da administração fazendo com que o volume da pata aumentasse consideravelmente nos grupos carragenina, no grupo indometacina quando comparado com o grupo salina. O pico do edema se dá na terceira hora o grupo carragenina apresentou uma variação de volume de  $0,13 \pm 0,009$  ml, dos grupos tratados somente o grupo AgNPcol+pc na dose de  $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  apresentou diferença estatística em todas as horas quando comparado ao grupo carragenina, variando  $0,031 \pm 0,006$  ml na terceira hora representando uma redução de 76,9% do edema em comparação ao grupo carragenina. Os grupos com componentes isolados, colágeno, polissacarídeo do cajueiro e AgNPcol, apesar de apresentarem inibição estatisticamente significativa com o grupo carragenina na terceira hora, também apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo AgNPcol+pc. Esses grupos apresentaram variação de  $0,08 \pm 0,003$ ;  $0,08 \pm 0,01$  e  $0,06 \pm 0,002$  respectivamente na terceira hora. Todos os grupos apresentaram redução do edema na quarta hora.

**Figura 4** – Edema de pata induzido por carragenina

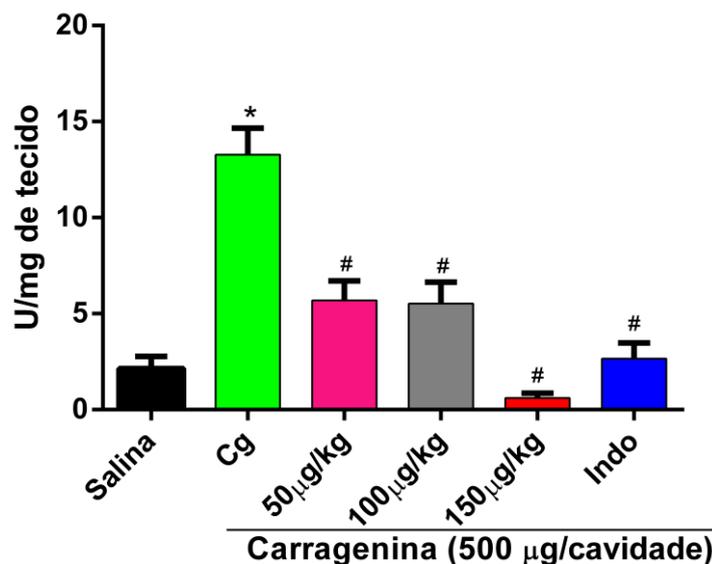


Legenda: O tratamento com AgNPcol+caju apresentou inibição estatisticamente significativa quando comparado a seus componentes isolados no edema de pata induzido por carragenina. Os resultados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo carragenina.

### 5.3. Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulo azurófilos dos neutrófilos, sendo, desse modo, amplamente utilizada como marcador de infiltração bioquímica para inflamação em vários tecidos (BRADLEY, et al., 1982). A figura 4 mostra que a aplicação de carragenina aumentou de forma estatisticamente significativa a concentração de MPO quando comparada ao grupo salina, apresentando uma concentração de  $13,27 \pm 1,38$  de MPO. Todas as doses de AgNPcol+pc utilizadas no estudo inibiram a concentração dessa enzima quando comparada ao grupo carragenina. Os grupos tratados com nanopartículas de prata apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo carragenina, na dose de  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  a concentração foi de  $5,68 \pm 1,02$ , na dose de  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  foi de  $5,53 \pm 1,11$ , na dose de  $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  foi de  $0,6 \pm 0,2$  e no tratamento padrão com indometacina a concentração foi de  $2,6 \pm 0,8$ . Essas concentrações representam uma redução de 57,2%, 58,4%, 95,4% e 80,4% em comparação ao grupo carragenina. A dose de  $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  ainda apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado às doses de  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ , sem, no entanto, apresentar diferença com os grupos salina e indometacina.

**Figura 5** - Efeito da administração intraperitoneal de AgNPcol+pc na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata

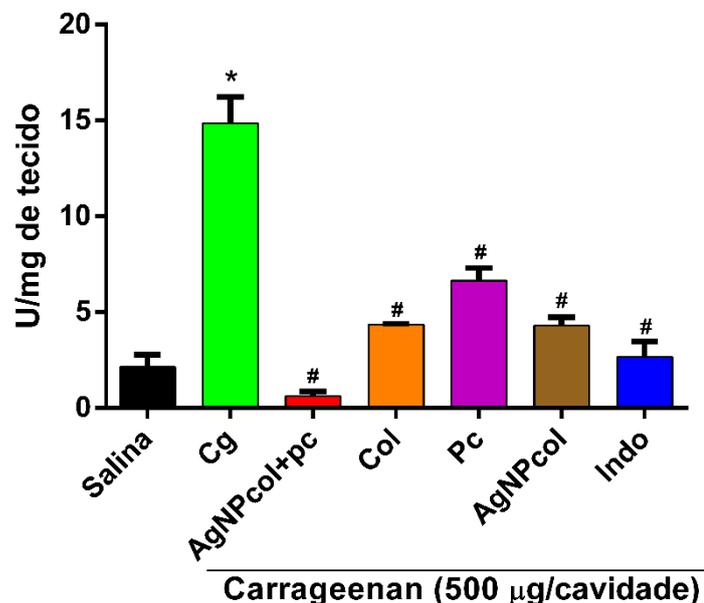


Legenda: Solução salina ou carragenina foi injetada na superfície plantar dos animais. Atividade da MPO foi detectado no tecido da pata após 4h. Os resultados são expressos em média $\pm$ SEM. \*indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina. # Indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo carragenina.

#### 5.4. Atividade da MPO na comparação com componentes isolados

A figura 4 mostra que a aplicação intraperitoneal de AgNPcol+pc e de seus componentes isolados inibiram a infiltração neutrofílica, mensurada através da atividade de MPO no tecido da pata dos animais. O grupo controle carragenina apresentou uma concentração da atividade de MPO de  $14,85 \pm 1,37$ ; Todos os grupos tratados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo carragenina, na AgNPcol+pc a concentração foi de  $0,6 \pm 0,2$  e no tratamento padrão com indometacina a concentração foi de  $2,6 \pm 0,8$ . Essas concentrações representam uma redução de 95,4% e 80,4% em comparação ao grupo carragenina. Nos grupos colágeno, polissacarídeo do cajueiro e AgNPcol, as concentrações foram de  $4,36 \pm 0,03$ ,  $6,6 \pm 0,6$  e  $4,2 \pm 0,4$ , respectivamente. O grupo AgNPcol+pc ainda apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos seus componentes isolados, sem, no entanto, apresentar diferença com os grupos salina e indometacina.

**Figura 6** - Efeito da administração intraperitoneal de AgNPcol+caju e seus componentes isolados na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata

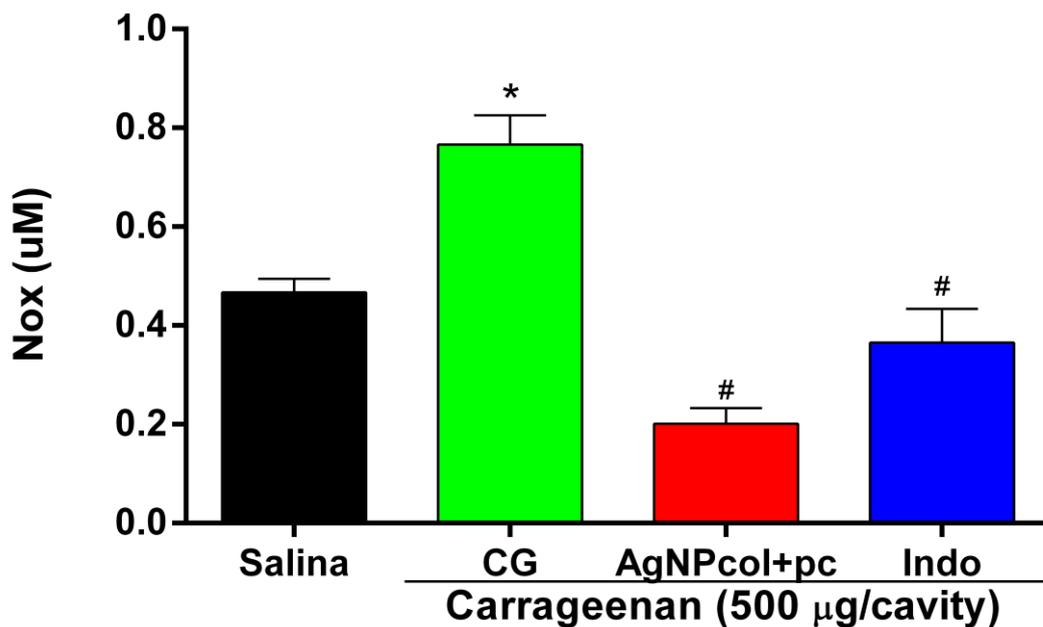


Legenda: Solução salina ou carragenina foi injetada na superfície plantar dos animais. Atividade da MPO foi detectada no tecido da pata após 4h. Os resultados são expressos em média ± SEM. \*indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina. # Indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo carragenina.

### 5.5. Nitrito

O tratamento com AgNPcol+caju na dose de 150µg/kg apresentou diferença significativamente estatística quando comparada ao grupo carragenina, esse por sua vez apresentou valores de  $0,79 \pm 0,05 \mu\text{M}$  de nitrito, enquanto o grupo com dose de 150µg/kg apresentou valores de  $0,18 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , apresentando uma redução de 77,2% quando comparado ao grupo carragenina. O grupo AgNPcol+pc apresentou ainda diferença estatística com o grupo tratado com fármaco padrão, indometacina, que apresentou valores de  $0,3 \pm 0,06 \mu\text{M}$ , o que significa uma redução de 50% quando comparado ao grupo carragenina.

**Figura 7** - Avaliação da ação da AgNPcol+caju no estresse oxidativo através da avaliação de nitrito no modelo de peritonite induzida por carragenina.



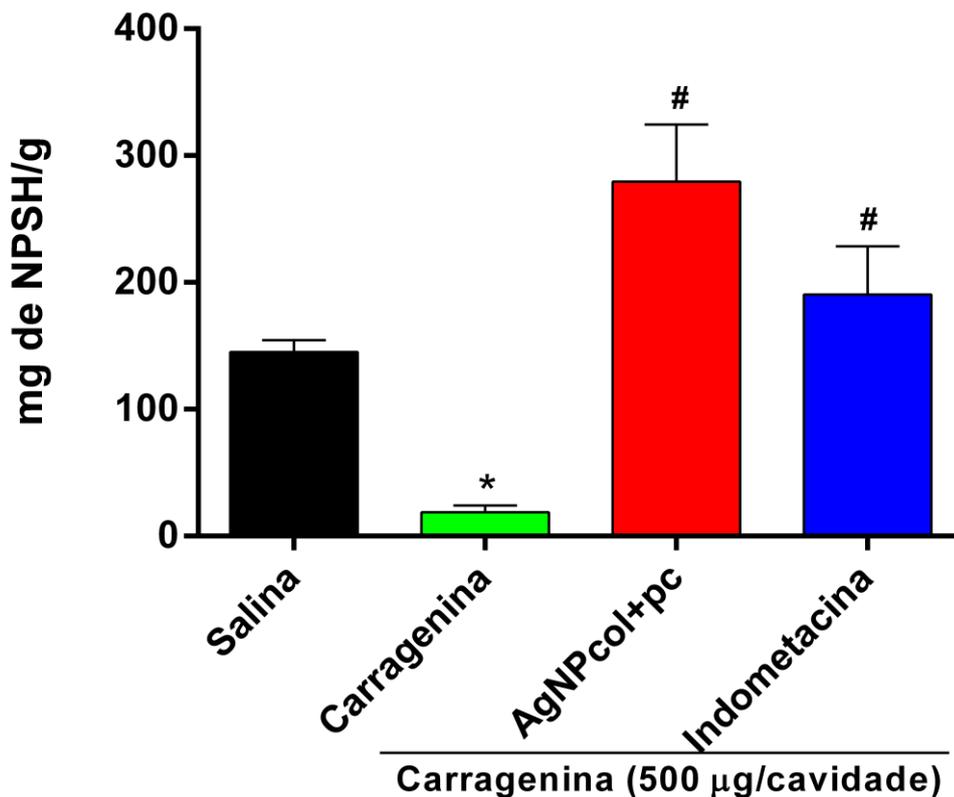
Legenda: A figura mostra que a aplicação de carragenina aumentou significativamente a quantidade de nitrito quando comparado ao grupo salina e que a dose de 150µg/kg diminuiu significativamente a quantidade de nitrito quando comparada ao grupo carragenina. Os valores são representados como média±SEM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo carragenina.

Fonte: Do autor.

### 5.6. GSH

Na avaliação da Glutathiona (GSH), o tratamento com AgNPcol+caju na dose de 150µg/kg apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo carragenina, esse por sua vez apresentou valores de  $18,78 \pm 5,3$  NPSH/g de GSH, enquanto o grupo com dose de 3ml/kg apresentou valores de  $279,4 \pm 45,16$  NPSH/g, esse grupo, no entanto, não apresentou diferença estatística com o grupo com tratamento padrão de indometacina, que apresentou valores de  $190,4 \pm 38,01$  NPSH/g.

**Figura 8** - Efeito da AgNPcol+caju na atividade da Glutathiona (GSH) na peritonite induzida por carragenina.



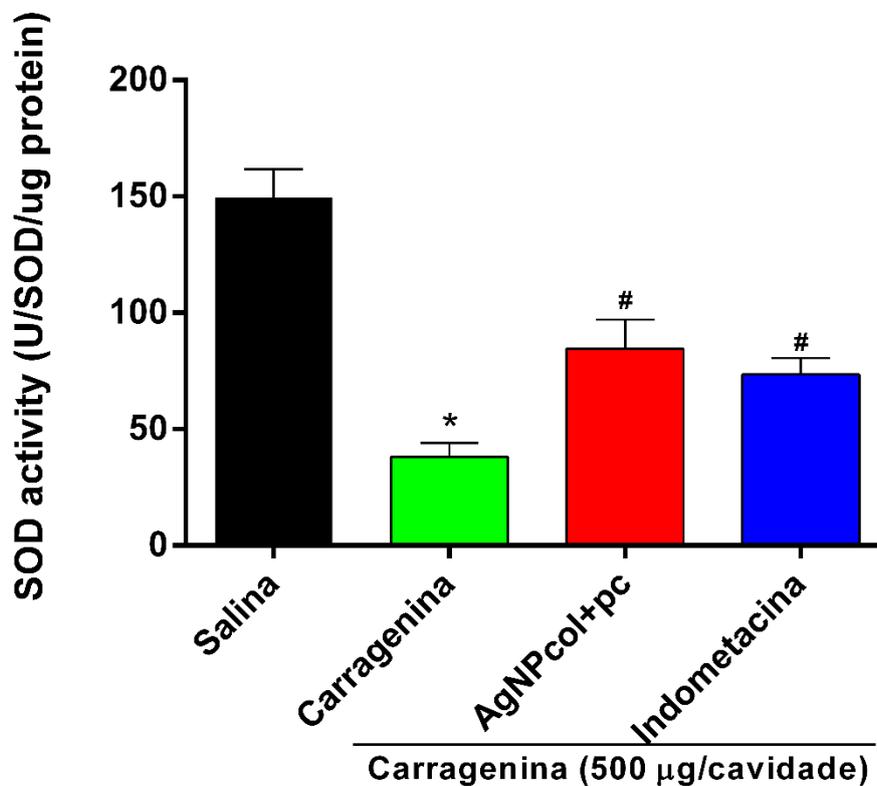
Legenda: A figura mostra que a dose de 150µg/kg aumentou significativamente a quantidade de GSH quando comparada ao grupo carragenina. Os valores são representados como média±SEM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo salina. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo carragenina.

Fonte: Do autor.

### 5.7. SOD

Na avaliação da enzima Super Óxido Dismutase (SOD), o tratamento com AgNPcol+caju na dose de 150µg/kg apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo carragenina, esse por sua vez apresentou valores de  $38,11 \pm 5,9$  U/SOD/µg de proteína, enquanto o grupo com dose de 3ml/kg apresentou valores de  $84,6 \pm 12,49$  U/SOD/µg de proteína, esse grupo, no entanto, não apresentou diferença estatística com o grupo com tratamento padrão de indometacina, que apresentou valores de  $73,61 \pm 6,93$  U/SOD/µg de proteína.

**Figura 9** - Efeito da AgNPcol+caju na atividade da Super Óxido Dismutase (SOD) na peritonite induzida por carragenina



Legenda: A figura mostra que a dose de 150µg/kg aumentou significativamente a quantidade de SOD quando comparada ao grupo carragenina. Os valores são representados como média±SEM. \* $p > 0,05$  quando comparado ao grupo salina. #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo carragenina.

Fonte: Do autor.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avalia o efeito antiinflamatório de uma nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro. Primeiramente avaliamos a dose ideal para o modelo experimental, a literatura apresenta divergências quanto à dose e à forma de aplicação de nanopartículas de prata no modelo experimental de inflamação aguda induzida por carragenina em roedores, são encontradas doses de 50µg/ml (CARDOSO, et al., 2016), 0,19ml/kg (DAVID, et al., 2014), 50mg/kg e 250mg/kg (EL-RAFIE E HAMED, 2014), 0,3mg/kg (MOLDOVAN, et al., 2017), 1ml/kg (MOONJIT DAS, et al., 2017) e 100mg/kg (RAMACHANDRAN E NAIR, 2011), esses estudos porém utilizaram doses fixas, nosso estudo utilizou três doses para avaliar qual seria melhor para o modelo experimental de inflamação aguda, utilizando a dose de Moonjit (2017) como referência.

Portanto nosso estudo realizou uma curva-dose resposta com as doses em dois níveis, uma dose ideal com base referenciada (1ml/kg, convertidos em 50µl/kg) e duas superiores a essa (2ml/kg e 3ml/kg, convertidos em 100µl/kg e 150µl/kg respectivamente) pois a dose referenciada, teve uma inibição de apenas 21%, segundo Moonjit Das (2017) essa inibição foi devido à inibição da enzima ciclooxigenase levando à uma inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo a prostaglandina, no nosso estudo encontramos uma melhor inibição do edema na dose de 150µl/kg (70% de inibição).

Avaliamos o potencial anti-inflamatório da AgNP no modelo experimental de edema de pata induzida por carragenina, dessa forma verificou-se que o agente flogístico estimulou a formação do edema em todos os animais, porém verificou-se que nos animais pré-tratados com NP na dose de 150µg/kg, foi capaz de inibir o edema de forma estatisticamente significativa, corroborando com resultados encontrados em trabalhos como o Cardoso et al (2016), David et al (2014), El-Rafie e Hamed (2014), Moldovan et al (2017), Moonjit Das et al (2017), Ramachandran e Nair (2011) e Kemp et al (2009).

A resposta inflamatória induzida por carragenina é um evento em duas fases: a primeira fase ou fase vascular (1-2 h) é caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular devido a liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos; a segunda fase ou fase celular é marcado pela infiltração de neutrófilos, além de liberação de bradicinina, prostaglandina E2, citocinas (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-

10) e Óxido Nítrico (NO), bem como de radicais livres derivados de neutrófilos (VASCONCELOS, et al., 2017).

Trabalhos como o de Cardoso et al (2016), David et al (2014), El-Rafie e Hamed (2014), Moldovan et al (2017), Moonjit Das et al (2017), Ramachandran e Nair (2011) e Kemp et al (2009), avaliaram o efeito anti-inflamatório de nanopartículas de prata em modelos experimentais *in vivo* de edema de pata induzido por carragenina. Nos seus trabalhos eles verificaram que as AgNPs foram capazes de inibir o edema de forma estatisticamente significativa entre duas e 48 horas, concordando com nosso estudo que mostrou a inibição desse edema entre 1 e 4 horas. A porcentagem de inibição do edema nesses trabalhos variou de 12,61% à 95,7%, e as melhores inibições foram encontradas no intervalo entre a segunda e a quarta hora após a indução do edema, corroborando com nossos achados.

Nós avaliamos ainda a atividade de inibição do edema de AgNPcol+pc com seus componentes isolados, colágeno, polissacarídeo do cajueiro e AgNPcol, a NP completa mostrou diferença estatística na inibição do edema quando comparado a seus componentes isolados, corroborando com dados encontrados na literatura, onde em todos os artigos analisados, a AgNP demonstrou ser mais eficiente na redução do edema quando comparado a seus componentes isolados (DAVID, et al., 2014; EL-RAFIE e HAMED, 2014; MOONJIT DAS, et al., 2017; CARDOSO, et al., 2016; RAMACHANDRAN e NAIR, 2011). Somente em dois estudos os resultados foram diferentes, no estudo de Kemp e colaboradores em 2009, a NP não mostrou diferença com seu componente isolado. No estudo de Moldovan e colaboradores em 2017, onde foi utilizado extrato de *Viburnum opulus L.* para sintetizar a AgNP, o extrato isolado se mostrou mais eficaz na inibição do edema do que a NP completa.

Além da análise da inibição do edema de pata no verificou-se, de forma indireta, o efeito dessas NP na quantidade de neutrófilos através da análise da enzima MPO, no nosso estudo a AgNPcol+pc reduziu de forma estatisticamente significativa nas três doses aplicadas uma hora antes da indução da inflamação, a dose de 150µg/kg, porém, apresentou uma redução ainda mais significativa quando comparada aos outros grupos, não tendo diferença quando comparada ao grupo controle negativo. Resultados similares aos encontrados no estudo de Cardoso e colaboradores (2017) onde comprovaram que uma nanopartícula de prata estabilizada com colágeno conseguiu reduzir de forma significativa a atividade dessa enzima no tecido da pata.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima bastante encontrada nos grânulos dos neutrófilos e é liberada quando essas células são ativadas, contribuindo para a patogênese da inflamação e, como sua atividade é intimamente ligada a infiltração de neutrófilos, é usada como um importante marcador desse evento (VASCONCELOS, et al., 2017). Nossos resultados da avaliação da MPO no tecido da pata mostram que a administração de carragenina aumenta a concentração dessa enzima, enquanto o pré-tratamento com a AgNPcol+pc (150µg/kg, i.p.) inibiu o aumento da atividade de MPO, reforçando a teoria de que a atividade antiinflamatória dessa nanopartícula envolve a inibição do infiltrado neutrofílico.

Na comparação da inibição da atividade da MPO da AgNPcol+pc com seus componentes, a NP completa mostrou uma inibição estatisticamente significativa quando comparada aos seus componentes. Cardoso e colaboradores (2016) foi comparado a AgNPcol com colágeno, e não verificaram diferença estatisticamente significativa entre a NP e seu composto estabilizador, ambos diminuíram a atividade da enzima.

Carvalho e colaboradores em 2015 analisaram os níveis de MPO em modelo de inflamação gástrica e verificaram que a goma do cajueiro reduziu os níveis dessa enzima de forma similar à droga padrão utilizada para o tratamento, a dose utilizada nesse estudo foi de 10mg/kg, dose muito acima da utilizada no nosso estudo, o que pode significar que a AgNP aumentou a especificidade desse composto, e a ação da AgNPcol+pc se dá através da soma dos efeitos de seus componentes isolados.

A MPO tem efeito também no estresse oxidativo pois através do  $H_2O_2$ , ela catalisa a oxidação de íons como o  $Cl^-$  produzindo ácidos como o ácido hipocloroso, um oxidante não específico, mais tóxico que o  $O_2^-$  e que o  $H_2O_2$ , gerando assim o estresse oxidativo relacionado à inflamação. A diminuição da atividade de MPO pode, portanto, representar uma atenuação do estresse oxidativo (VASCONCELOS, et al., 2017).

No nosso estudo ainda foi avaliado o potencial antioxidante da AgNPcol+pc o avaliar seus efeitos sobre os níveis de GSH, SOD e nitrito e nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, como no estudo de Ramachandran e Nair em 2011 foi avaliado o potencial anti-oxidante das AgNPs sintetizadas com *T. catapa*, administrado via oral na dose de 250mg/kg, um dia após a administração os ratos sofreram eutanásia e como resultado foi visto que essa nanopartícula conseguiu diminuir MDA (27,27% de diminuição), e aumentou SOD e GSH em

32,29% e 34,49%, comprovando o potencial anti-oxidante que as nanopartículas tem, concordando com nossos resultados, onde a administração intraperitoneal de AgNP+caju manteve os níveis de GSH, SOD e diminuir os níveis de nitrito.

O efeito potencial antioxidante da nanopartícula de prata pode ser evidenciado pela diminuição dos níveis de nitrito e aumento dos níveis de GSH e SOD. Os níveis de GSH é um dos principais marcadores de estresse oxidativo relacionado ao processo patológico, e pode ser usado para avaliar a atividade redox de moléculas bioativas em proteção contra a inflamação. Glutathione é um componente do sistema antioxidante celular. É um tripeptídeo que atua na defesa celular contra o estresse oxidativo através de sua capacidade redutora do grupo sulfídrico reativo (VASCONCELOS, et al., 2017).

A SOD faz parte do sistema de defesa antioxidante enzimático e age por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência dos danos oxidativos. Essa enzima pode ser encontrada sub duas formas: no citoplasma onde é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn) e na mitocôndria onde necessita do manganês (SOD-Mn) como co-fator para desempenhar suas funções. Por meio da reação de dismutação a SOD catalisa a geração de peróxido de hidrogênio a partir do radical superóxido, o  $H_2O_2$  é então transformado em água através da glutathione peroxidase (GPx), essa reação, porém depende da conversão da Glutathione reduzida (GSH) em sua versão oxidada (GSSG). Portanto a manutenção dos níveis de GSH é necessária para a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathione e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa antioxidantes (BARBOSA, et al., 2010).

Os radicais livres desempenham um importante papel na resposta inflamatória aguda induzida por carragenina. Nesse modelo de inflamação aguda, de modo similar ao que acontece nos seres humanos, há um aumento na síntese de NO, a partir de L-arginina pela iNOS em macrófagos ativados. Essa superprodução de NO pode induzir dano celular e perpetuar a resposta inflamatória, além de ser um importante mediador nos mecanismos citotóxicos/citostáticos da imunidade inata (DENG, et al., 2011).

Durante o processo inflamatório, há o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios, NO e PGE2, através da iNOS induzível e COX-2, respectivamente. INOS normalmente não é detectável em células normais, porém o aumento de sua expressão é induzido por vários estímulos, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (DENG, et al., 2011). O óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio é um metabólico sintetizado durante a reação de oxidação completa do nitrogênio. Esse processo é catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), e por fim o NO reage ativamente com radicais O<sub>2</sub>, superóxido, tióis, metais de enzimas e é oxidado para íons inativos de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (CORREA-ARAGUNDE, et al., 2013). Portanto, a rota metabólica do NO é a oxidação natural para nitrato e nitrito. Esses metabólicos do óxido nítrico são moléculas homeostáticas centrais na biologia do NO. Devido ao vínculo intrínseco nitrito e NO, a detecção e quantificação precisa do nitrito em amostras biológicas tornou-se método confiável para a avaliação da quantidade de NOS, além de aquisição de informações sobre a origem do estímulo da síntese da NOS e com isso compreender os efeitos do NO, usando nitrito como marcador indireto dos níveis de NO em sangue e tecidos (YAO, et al., 2004).

Nesse estudo nós avaliamos a quantidade de NO indiretamente através da avaliação do nível de nitrito em um modelo de peritonite induzida pela injeção de carragenina, nossos resultados mostram que a administração de carragenina foi responsável por elevar os níveis de nitrito, porém, o pré-tratamento com AgNPcol+caju uma hora antes da indução da inflamação de forma intraperitoneal foi capaz de inibir a elevação desses níveis. Esses dados corroboram com a literatura, onde um estudo mostrou que a AgNP reduziu os níveis de nitrito em até 60% em algumas concentrações testadas (SINGH, et al., 2017).

A redução nesses níveis de NO possivelmente aconteceu por conta da inibição de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , que são responsáveis por induzir a iNOS, aumentando assim os níveis de NO (DENG, et al., 2011). Outra hipótese pode ser por conta da redução da migração de leucócitos, entre eles os macrófagos, que as nanopartículas de prata podem causar dano mitocondrial nessas células, causando apoptose, resultando na morte dos macrófagos, sem essas células ativadas para induzir a produção de NO, os níveis desse diminuiriam significativamente (SINGH E RAMARAO, 2012).

Em diversas condições fisiopatológicas associadas com inflamação ou estresse oxidativo, essas espécies reativas de oxigênio têm relação com a mediação

de dano celular através de diversos mecanismos independentes incluindo a inativação de uma variedade de enzimas antioxidantes. Dada a importância do status oxidante na formação do edema, o efeito antiinflamatório exibido por esse composto, nesse modelo, pode estar relacionado a um potencial antioxidante (BIGNOTTO, et al., 2009).

Yilma e colaboradores (2013) sugere que as AgNPs podem ser aplicáveis à outras doenças, como por exemplo no caso da infecção por *Chlamydia trachomatis*, pois uma característica dessa infecção é a indução de respostas inflamatórias severas que desempenham papéis críticos na sua patogênese. Ao avaliar os níveis de diversos mediadores inflamatórios, os autores sugerem que o efeito das nanopartículas não é generalizado, mas sim altamente seletivo, dependendo do tipo de patógeno e das células as quais são expostas.

Apesar da evidência de vários estudos mostrarem que as AgNPs podem modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, através de danos causados à mitocôndria, resultando em apoptose e morte de macrófagos e neutrófilos, células responsáveis pela produção dessas citocinas, ainda não está bem documentado de que forma as NP desempenham suas propriedades anti-inflamatórias (WONG, et al., 2009; SHEIKPRANBABU, et al., 2009; SINGH E RAMARAO, 2012).

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a AgNPcol+pc aplicada de forma intra-peritoneal com a dose de 150µg/kg tem potencial antiinflamatório, ao inibir a formação do edema de pata induzida por carragenina e reduzir a quantidade de neutrófilos no tecido da pata como mostrado na redução da atividade da MPO. Esse potencial anti-inflamatório é maior do que o encontrado em seus componentes isolados, mostrando que a AgNPcol+pc de forma completa inibiu o edema de forma mais eficiente do que seus componentes isolados. A AgNPcol+pc também apresenta um potencial antioxidante ao diminuir os níveis de nitrato, subproduto da via inflamatória do óxido nítrico e manter níveis de GSH, antioxidante endógeno não enzimático e SOD um antioxidante endógeno enzimático.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKEN, J. D.; FINKE, R. G. A review of modern transition-metal nanoclusters: Their synthesis, characterization, and applications in catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. [S.l: s.n.], 1999.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antimicrobial effects of TiO(2) and Ag(2)O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future microbiology**. [S.l: s.n.], 2011.

ANDRADE, K. C. S. et al. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 5, p. 667–671, 2013. Disponível em: <<http://www.revistapolimeros.org.br/doi/10.4322/polimeros.2013.004>>.

BANERJEE, J.; R.T, NARENDHIRAKANNAN. Biosynthesis of Silver Nanoparticles From *Syzygium Cumini* (L.) Seed Extract and Evaluation of Their in Vitro Antioxidant Activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 6, n. 3, p. 961–968, 2011.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**. v. 4, n. 23, p. 629-643, 2010.

BARSOTTI, R. J.; O'CONNELL, M. S.; STELLACCI, F. Morphology control in self-assembled monolayers written by dip pen nanolithography. **Langmuir**, v. 20, n. 12, p. 4795–4798, 2004.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. O PROCESSO INFLAMATÓRIO. 2. Componentes e Eventos Celulares. **Medicina**, p. 1–17, 2006.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. PROCESSO INFLAMATÓRIO. 1. Alterações Vasculares e Mediação Química. **Medicina**, p. 1–15, 2006.

BERCE, C. et al. In vivo assessment of bone marrow toxicity by gold nanoparticle-based bioconjugates in CrL:CD1(ICR) mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4261–4273, 2016.

BHOL K. SCHECHTER P. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. **Brazilian Journal of Dermatology**. v. 6, n. 152, p. 1235-1242, 2005.

BIGNOTTO, L. et al. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw edema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. **British Journal of Nutrition**. n. 102, p. 126-133, 2009.

BLACKMAN, J. A. **Metallic nanoparticles**.1. ed. Amsterdã: Elsevier, 2008.

BRADLEY PP, PRIEBAT DA, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigation in Dermatology**. v. 78, p. 206–9, 1982.

CARDOSO V.S. et al. Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. **Materials Science and Engineering C**. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.025>.

CARVALHO, C. N. **Caracterização de nanopartículas de prata coloidais dispersas em solos**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.

CARVALHO, N. S. Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a complex Heteropolysaccharyde of *Anacardium occidentale*, in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. **Drug Development Research**. v. 76, p. 143-151. 2015.

CHAVES L.S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology Immunotoxicology**; v. 35, p. 93–100, 2013.

CORREA-ARAGUNDE, N. et al. Structure diversity of nitric oxide synthases (NOS): the emergence of new forms in photosynthetic organisms. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-3, 2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavanoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista virtual de química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/rvq>>.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUMBERLAND, S. A.; LEAD, J. R. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 52, p. 9099–9105, 2009.

DANIEL, M. C. M.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 293–346, 2004.

DAS, M. et al. Biosynthesis of AgNPs using aqueous leaf extract of *Ipomoea eriocarpa* and their anti-inflammatory effect on carrageenan-induced paw edema in male Wistar rats. **IET nanobiotechnology**, v. 11, n. 3, p. 225–229, 2017.

DAVID, L. et al. Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 767–777, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.018>>.

DENG, J. S. et al. Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1161–1171, 2011.

DIAS, J. M. et al. Gabapentin, a Synthetic Analogue of Gamma Aminobutyric Acid, Reverses Systemic Acute Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1826–1836, 2014.

DICK, L. A. et al. Metal Film over Nanosphere (MFON) Electrodes for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Improvements in Surface Nanostructure Stability and Suppression of Irreversible Loss. p. 853–860, 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp013638l>>.

DIVYA, K. P. et al. In Situ Synthesis of Metal Nanoparticle Embedded Hybrid Soft Nanomaterials. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 9, p. 1671–1680, 2016.

DURÁN, N. et al. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949–959 ST–Potential Use of Silver Nanoparticle, 2010.

EL-RAFIE, H. M.; HAMED, M. A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four *Terminalia* species. **Adv. Nature Science and Nanoscience. Nanotechnology**, v. 5. n. 035008. 2014.

FABREGA, J. et al. Silver nanoparticle impact on bacterial growth: Effect of pH, concentration, and organic matter. **Environmental Science {&} Technology**, v. 43, n. 19, p. 7285–7290, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19848135>>.

FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. **Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nature Reviews Microbiology**. [S.l.: s.n.], 2009.

FREITAS M.; LIMA J. L. F. C.; FERNANDES E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analitical Chemical Acta**. v. 1, n. 649, p. 8-23, 2009.

GANGWAL, S. et al. **Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. Environmental Health Perspectives**. [S.l: s.n.], 2011.

GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutura: atividade biológica**. São Paulo. Escola de engenharia de São Carlos. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado apresentada no programa de pós-graduação interunidades em bioengenharia. 2007.

GUAY, J. et al. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24866–24872, 2004.

GULRAJANI, M. L. et al. Preparation and Application of Silver Nanoparticles on Silk for Imparting Antimicrobial Properties. **Journal of applied polymer science**, v. 108, n. October 2007, p. 614–623, 2008.

HADMA S. F.; M. do C. RANGEL **Química. Nova**, v. 32, n. 7, 1860-1870, 2009.

**HERBARIO**: Site web: [www.herbario.com.br/cultivar.html](http://www.herbario.com.br/cultivar.html), 10 de maio 2006

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 5 Suppl, p. 206-212, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1560>>.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. **Engineering. Nanoparticles**. [S.l.: s.n.], 2016. p. 1–18. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128014066000017>>.

HUANG, Z. et al. Controllable Synthesis and Biomedical Applications of Silver Nanomaterials. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 9395–9408, 2011. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jnn.2011.5317>>.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1–3, p. 396–414, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042>>.

JÚNIOR, J. O. DE O.; JUNIOR, C. S. A. P.; COHEN, C. P. **Inflammatory mediators of neuropathic pain**. Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, v. 17, n. Suppl 1, p. 35–42, 2016.

KALISHWARALAL, K. et al. **Silver nano - A trove for retinal therapies**. **Journal of Controlled Release**. [S.l.]: Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.022>>., 2010.

KAMAT, P. V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 32, p. 7729–7744, 2002.

KEMP, M. M. et al. Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Stabilized with Glycosaminoglycans having distinct Biological Activities. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 2528–2543, 2010.

LIMA, R. R. et al. ARTIGO ORIGINAL. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29–34, 2007.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 163–171, 2007. Disponível em:

<[http://www.jped.com.br/conteudo/Ing\\_resumo.asp?varArtigo=1717&cod=&idSecao=1](http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1717&cod=&idSecao=1)>.

MAIA-SILVA, C. et al. **Guia de plantas visitadas por abelhas na caatinga**. Fortaleza: Fundação Brasil Cidadão, 2012.

MAJNO G. JORIS I. **Cells, tissues, and disease: principles of general pathology**. 1st ed. New York: Oxford University Press; 2004.

MARKUS, T. et al. Neuroprotective dobutamine treatment upregulates superoxide dismutase 3, anti-oxidant and survival genes and attenuates genes mediating inflammation. **BMC Neuroscience**, v. 19, p. 9, 2018.

MATHEW, T. V; KURIAKOSE, S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 14–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.05.017>>.

MCEVER, R. P. Selectins: Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. **Thrombosis and haemostasis**. v. 65, p223-228, 1991.

MELO, G. B. de. **Síntese verde e caracterização de nanopartículas de prata usando extrato aquoso de erva mate (Ilex paraguariensis )**. 2015. 38 f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015. Disponível em: <[http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4882/1/CM\\_COEAL\\_2015\\_2\\_07.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4882/1/CM_COEAL_2015_2_07.pdf)>.

MÓCSAI, A. et al. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovascular Res**. v. 107, n. 3, p. 373-385, 2015.

MOLDOVAN, B. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory properties of green synthesized silver nanoparticles using *Viburnum opulus* L. fruits extract. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 720–727, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.122>>.

MOUGABURE-CUETO, G.; SFARA, V. **The analysis of dose-response curve from bioassays with quantal response: Deterministic or statistical approaches?** *Toxicology Letters*. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.001>>., 2016.

MOURA, R. E. DE. **Síntese de nanopartículas à de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos Síntese de nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos Raquel Evangelista de Moura**. Fortaleza. Universidade Federal do Ceará. Tese apresentada no programa de pós-graduação em química **base**, UFC. 2009.

MURPHY, C. J. Sustainability as an emerging design criterion in nanoparticle synthesis and applications. *Journal of Materials Chemistry*, v. 18, n. 19, p. 2173–2176, 2008.

NADWORNÝ P.; et al. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine*. v. 3, n. 4, p. 241-251, 2008.

NICEWARNER-PEÑA, S. R. et al. Submicrometer Metallic Barcodes. *Science*, v. 294, n. October, p. 137–141, 2001.

PACIONI, N. L. et al. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. *Silver Nanoparticle Appl.* [S.l.: s.n.], 2015. p. 13–46. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-11262-6>>.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. *The Lancet*. v. 357, p. 1777-1789, 2001.

PATAKFALVI, R.; PAPP, S.; DÉKÁNY, I. The kinetics of homogeneous nucleation of silver nanoparticles stabilized by polymers. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 9, n. 3, p. 353–364, 2007.

PATAKFALVI, R.; VIRÁNYI, Z.; DÉKÁNY, I. Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 3, p. 299–305, 2004.

PAULA, H. C. B. et al. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 173–178, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2010.08.013>>.

PEREZ, J.; BAX, L.; ESCOLANO, C. Roadmap Report on Nanoparticles. **Willems & van de wildenberg**, n. November, p. 1–57, 2005.

POIRIER M. et al. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. **Journal of Applied Toxicology**. v. 4, n. 34, p. 404-412, 2014.

QUELEMES, P. V et al. Development and Antibacterial Activity of Cashew Gum-Based Silver Nanoparticles. p. 4969–4981, 2013.

RAMACHANDRAN, L.; KRISHNAN, C.; NAIR, K. Therapeutic Potentials of Silver Nanoparticle Complex of  $\alpha$ -Lipoic Acid. v. 1, n. 2, p. 17–24, 2011.

RIGO, C. et al. Active silver nanoparticles for wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4817–4840, 2013.

RUTBERG, F. G. et al. Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 421, n. 1, p. 191–193, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1607672908040078>>.

SANTIAGO, R. F. et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p. 2203–2215, 2015.

SERHAN, C. N. A search for endogenous mechanism of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. **Histochemical Cell Biology**. v. 122, n. 4, p.305-321, 2004.

SHEIKPRANBABU S. et al. Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1beta-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. **Journal of Nanobiotechnology**. v. 1, n. 10, p.7-8, 2009.

SIES H., STAHL W. Vitamins e and c, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am Journal of Clinical Nutrition** 1995;62(6):1315-21.

SIGNORI, A. M. et al. Formation of catalytic silver nanoparticles supported on branched polyethyleneimine derivatives. **Langmuir**, v. 26, n. 22, p. 17772–17779, 2010.

SILVA V.G.et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **J Nat Prod** 2013; 76:1071–7.

SILVA, I. S. et al. Evaluation of anti-inflammatory potential of aqueous extract and polysaccharide fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1105–1116, 2017.

SILVA, R. O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant- derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. November 2013, p. 184–192, 2014.

SIMON, T. et al. Design of FLT3 Inhibitor - Gold Nanoparticle Conjugates as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2015.

SINGH R.; RAMARAO P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. **Toxicology Letter**. v. 2, n. 213, p. 249-259, 2012.

SINGH, P. et al. In vitro anti-inflammatory activity of spherical silver nanoparticles and monodisperse hexagonal gold nanoparticles by fruit extract of *Prunus serrulata*: a green synthetic approach. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**. p.1-11, 2017.

SOUSA, G. D. et al. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educação Química**. v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.

SUH, W. H. et al. **Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience**. **Progress in Neurobiology**. [S.l: s.n.], 2009.

SUN L, ZHANG Z, DANG H. A novel method for preparation of silver nanoparticles. **Mater Letter**. v. 57:3874–3879, 2003.

TAYLOR, L. N. D., **The healing power of rainforest herbs: A guide to understand herbal medicinals**. Square one Publishers, inc. Garden City Park, 535p, 2005.

TIAN J. *et al.* Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. **Medical Chemical**. v. 1, n. 2, p. 129-136, 2007.

TYAGI, P. K. Production of Metal Nanoparticles from Biological Resources. **International Journal of Current Microbiological Applied Science (2016)**, v. 5, n. 3, p. 548–558, 2016.

VASCONCELOS, A. G. et al. Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. **Food Research International**, v. 99, n. Pt 2, p. 959–968, 2017.

WANG D.H. et al. Enhancement of donor-acceptor polymer bulk heterojunction solar cell power conversion efficiencies by addition of Au nanoparticles. **Angew Chem Int**. 50:5519–5523. Ed. 2011. doi: 10.1002/anie.201101021.

WIESENTHAL, A. et al. **Nanoparticles: Small and mighty. International Journal of Dermatology.** [S.l: s.n.], 2011.

WONG, K. K. Y. et al. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. **Medical Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 1129–1135, 2009.

XU, Y. et al. A novel 76-mer peptide mimic with the synergism of superoxide dismutase and glutathione peroxidase. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. Mar, 2018.

YAO, D. et al. Determination of nitric oxide in biological samples. **Microchemical Acta**, v. 147, n. 1, p. 1-20, 2004.

YILMA A. et al. Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. **International Journal of Nanomedicine**. v. 1, n. 8, p. 2421-2432, 2013.

YOU, C. et al. **The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. Molecular Biology Reports.** [S.l: s.n.], 2012.