



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

ISABELA DE SOUZA BRAÚNA

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULA DE
PRATA ESTABILIZADA COM COLÁGENO E GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium
occidentale L.*)**

PARNAÍBA – PI

2019

ISABELA DE SOUZA BRAÚNA

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE 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 total para a obtenção do conceito mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas.

Desempenho Humano: Diagnóstico e Funcionalidade

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Saura Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras

PARNAÍBA – PI

2019

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

B816e Braúna, Isabela de Souza

Efeito anti-inflamatório e antioxidante de nanopartícula de prata estabilizada com o colágeno e goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) [recurso eletrônico] / Isabela de Souza Braúna. – 2019.

1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Vinícius Saura Cardoso.

1. Nanopartículas. 2. Anti-inflamatório. 3. Antioxidante. 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação. I. Título.

CDD: 615.1

ISABELA DE SOUZA BRAÚNA

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE 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 total para a obtenção do conceito mestre em Ciências Biomédicas.

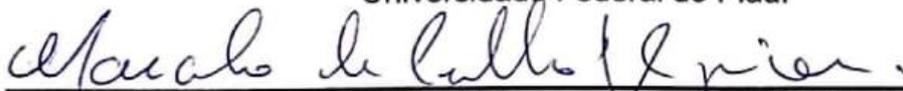
Aprovado Em: 27/06/2019

BANCA EXAMINADORA



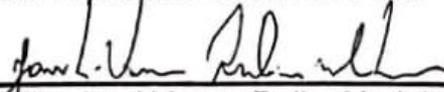
Prof. Dr. Vinicius Saura Cardoso (Orientador)

Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Figueiras (Co-Orientador)

Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

Universidade Federal do Piauí

À Deus toda minha gratidão e devoção!

- Todo esforço traz recompensa.

AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos os envolvidos nessa jornada, sem exceções!

RESUMO

A descoberta de nanomateriais naturais tem despertado interesse tanto na pesquisa quanto no mercado de fármacos, sendo as nanopartículas de prata as mais utilizadas no meio da pesquisa devido às suas inúmeras aplicações. Essas nanopartículas podem estar associadas a diferentes compostos, afim de produzir um efeito em potencial diante de um organismo vivo. Portanto, o presente estudo visa testar o potencial antiinflamatório e antioxidante de uma nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro por aplicação tópica, em modelos experimentais de edema de pata e peritonite. Foi analisado o potencial antiedematogênico de uma nanopartícula de prata nas doses de 25 ul, 50 ul e 75 ul aplicadas de forma tópica, ação em edema proporcionado por carragenina, melhor dose em mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandina E2 e 48/80), sua ação na migração neutrofílica e permeabilidade vascular. Foi avaliada também a ação contra o estresse oxidativo pela determinação de glutathiona reduzida (GSH), nitrito, superóxido dismutase (SOD) na peritonite somente na dose de 75 ul. Os resultados mostraram que a nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro na dose de 75 ul possui potencial antiinflamatório e antiedematogêncio ao inibir o infiltrado inflamatório durante o pico do edema de carragenina e mediadores inflamatórios. O composto também demonstrou reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase de forma significativa quando comparado ao grupo controle, assim como a permeabilidade vascular. 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. Em conclusão, estes dados mostram que a nanopartícula de prata, colágeno e goma do cajueiro reduz a resposta inflamatória através da inibição de eventos vasculares e celulares, por modular a migração de neutrófilos, pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e por reduzir o estresse oxidativo.

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

ABSTRACT

The discovery of natural nanomaterials has aroused interest both in research and in the drug market, with silver nanoparticles being the most used in the research environment due to their numerous applications. These nanoparticles may be associated with different compounds in order to produce a potential effect on a living organism. Therefore, the present study aims to test the antiinflammatory and antioxidant potential of a silver nanoparticle stabilized with collagen and cashew gum by topical application in experimental models of paw edema and peritonitis. The antiedematogenic potential of a silver nanoparticle at 25 μ l, 50 μ l and 75 μ l applied topically, action on carrageenan edema, best dose on inflammatory mediators (histamine, prostaglandin E2 and 48/80), its antimicrobial effect was analyzed. action on neutrophil migration and vascular permeability. The action against oxidative stress was also evaluated by the determination of reduced glutathione (GSH), nitrite, superoxide dismutase (SOD) in peritonitis only at a dose of 75 μ l. The results showed that the silver nanoparticle stabilized with collagen and cashew gum at a dose of 75 μ l has antiinflammatory and antiedematogenesis potential by inhibiting the inflammatory infiltrate during the peak of carrageenan edema and inflammatory mediators. The compound has also been shown to significantly reduce myeloperoxidase enzyme activity when compared to the control group, as well as vascular permeability. The antioxidant potential of nanoparticle is demonstrated by the reduction of nitrite levels and maintenance of GSH and SOD levels when compared to the carrageenan group. In conclusion, these data show that silver nanoparticle, collagen and cashew gum reduces the inflammatory response by inhibiting vascular and cellular events, modulating neutrophil migration, inhibiting proinflammatory cytokine production and reducing oxidative stress.

Keywords: 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- α – 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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos avaliados na curva dose resposta em edema de pata induzida por carragenina.	35
Tabela 2. Grupos utilizados durante o edema de mediadores inflamatórios.....	37
Tabela 3. Grupos utilizados durante a peritonite induzida por carragenina.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema mostrando a preparação de nanopartículas de prata (AgNP) contendo íons borohidreto adsorvidos, que criam forças repulsivas capazes de estabilizar a solução coloidal.....	19
Figura 2. Migração de célula leucocitária para o meio intersticial.	27
Figura 3. Gráfico da banda característica da formação de AgNPs (pico de absorção 415 nm).	33
Figura 4. Representação esquemática do processo de avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante da AgNPcol+gc	34
Figura 5. Modelo de tricotomização do grupo AgNPcol+gc para tratamento da peritonite, onde é feita a equivalência da área da pata (parte de cima e de baixo) com a área a ser tricotomizada no abdômen, a fim de ter uma proximidade de valores entre a área de tratamento.	38
Figura 6. Edema agudo de pata induzido por carragenina – curva dose resposta ...	41
Figura 7. Edema agudo de pata induzido por carragenina – comparativo dos compostos isolados.....	42
Figura 8. Efeito da administração tópica de AgNPcol+gc na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata.....	43
Figura 9. Efeito da administração intraperitoneal de AgNPcol+gc, Colágeno, Goma do cajueiro e AgNPcol na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata.....	44
Figura 10. Edema de pata induzido por histamina com tratamentos AgNPcol+gc T.	45
Figura 11. Edema de pata induzido por PGE2 com tratamentos AgNPcol+gc 75µl..	46
Figura 12. Edema de pata induzido por 48/80 com tratamento AgNPcol+gc 75µl. ...	47
Figura 13. Avaliação da ação da AgNPcol+caju no estresse oxidativo através da avaliação de nitrito no modelo de peritonite induzida por carragenina.....	48
Figura 14. Efeito da AgNPcol+gc 75 µl na atividade da Glutathiona (GSH).	49
Figura 15. Efeito da AgNPcol+gc 75 µl na atividade da Super Óxido Dismutase (SOD).	
50	
Figura 16. Efeito da AgNPcol+gc 75µl na permeabilidade vascular na peritonite induzida por carragenina.	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Nanopartículas e Nanopartículas Metálicas	16
2.2. Nanopartículas de Prata (AgNPs)	17
2.3. Síntese de nanopartícula de prata	18
2.4. Colágeno.....	20
2.4.1. Colágeno Hidrolisado	21
2.5. Goma do Cajueiro	22
2.6. Inflamação.....	23
2.6.1. Fase Vascular da inflamação.....	24
2.6.2. Fase celular da inflamação.....	26
2.7. Estresse oxidativo	29
2.8. Fármacos antiinflamatórios	29
3. OBJETIVO GERAL	31
3.1. Objetivos Específicos	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Drogas e Reagentes	32
4.2 Preparação da Nanopartícula de prata, colágeno e goma do cajueiro	32
4.3 Esquema geral procedimento experimental	34
4.4 Animais Experimentais.....	34
4.5 Indução de edema de pata por carragenina e bases de tratamento – Curva dose resposta	35
4.6 Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios.....	36
4.7 Modelo de peritonite induzida por carragenina	37
4.8 Avaliação da ação da mieloperoxidase (MPO)	38
4.9 Dosagem de glutatona (GSH)	39
4.10 Dosagem de Nitrito	39

4.11	Dosagem de Superóxido Dismutase.....	40
4.12	Análise da permeabilidade.....	40
4.13	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Edema de pata induzido por carragenina.....	41
5.2	Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	42
5.3	Efeito da AgNPcol+gc sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos.....	44
	Legenda:.....	45
5.4	Efeito da AgNPcol+gc sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E2 em camundongos.....	45
5.5	Efeito da AgNPcol+gc sobre o edema de pata induzido por 48/80 em camundongos.....	46
5.6	Nitrito.....	47
5.7	GSH.....	48
5.8	SOD.....	49
5.9	Permeabilidade vascular.....	50
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÃO.....	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1.INTRODUÇÃO

A descoberta de nanomateriais naturais tem despertado e gerado interesse tanto na pesquisa quanto no mercado de fármacos, produtos de cuidados pessoais e da área biomédica. Essa natureza interdisciplinar da nanotecnologia mostra que ao utilizar um conjunto de técnicas baseadas na física microscópica, na química e biologia molecular, tem como objetivo obter compostos mais resistentes, mais baratos, melhor absorvíveis e com potenciais biológicos mais eficazes (CARPENTER; LANNOY; WIESNER, 2015).

Nanopartículas (NPs) são termodinamicamente instáveis e têm a tendência natural de se agregar. Desta forma o grande desafio está na criação de nanomateriais estáveis (ou seja, que permaneçam em nanoescala, sem sofrer decomposição, agregação e crescimento) e monodispersos, tanto relacionado a forma, quanto ao tamanho de suas partículas, que aceitem ser dispersos, manipulados, depositados sobre substratos, mantendo suas características. (WILCZEWSKA et al., 2012; BROWN; HUTCHISON, 2001).

As nanopartículas de prata (AgNPs) são as NPs mais utilizadas no meio da pesquisa devido às suas inúmeras aplicações. Elas possuem propriedades físico-químicas muito características, onde podemos citar sua flexibilidade, maleabilidade, condutividade térmica e elétrica elevada em relação a qualquer outro metal. Em destaque também, está a utilização das AgNPs no espectro antimicrobiano, por ter baixo custo de obtenção, são opções de primeira escolha em aplicações biológicas, cremes e cosméticos, adesivos, dentre outras situações de aplicação e produtos de consumo (GAILLET; ROUANET, 2015).

Na área de pesquisa nanotecnológica, o suporte de colágeno têm sido amplamente utilizado em experimentos biológicos para a introdução de substâncias químicas e farmacêuticas. Em geral, estudos envolvendo colágeno são extremamente importantes devido as diferenças entre suas estruturas e propriedades, que podem ser benéficas em aplicações terapêuticas, como sistemas de liberação de medicamentos, fator de crescimento, sistemas de ancoragem de formação celular e reparo tecidual (CARDOSO et al., 2014).

A goma de cajueiro é extraída do tronco da árvore de *Anacardium occidentale* L. encontrada em regiões tropicais e original do Brasil, essa planta pode ser

encontrada em abundância pelo nordeste do país, principalmente nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. As pesquisas envolvendo polissacarídeos apontam para o futuro promissor, devido suas características cicatrizantes, antimicrobianas, biodegradáveis e por ter baixa toxicidade (LIMA et al., 2013, CARDOSO et al., 2014). Todo composto precisa de uma via de administração, para que substâncias penetrem no organismo e façam seu efeito. A entrega eficiente de drogas, cosméticos e substâncias em geral para dentro do organismo através da pele tem sido um objetivo dos pesquisadores a décadas, onde, a pele é uma área atrativa para aplicações devido à sua extensão e facilidade de acesso. (SCHOELLHAMMER; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2014, PAUDEL et al., 2010).

As respostas inflamatórias agudas mediadas por células do sistema imune são consideradas benéficas se executadas de maneira local e controlada, pois atuam de forma rápida e efetiva na eliminação de estímulos patogênicos e retornam o tecido afetado a um estado homeostático normal estimulando, inclusive, a atividade leucocitária. Portanto, inflamação pode ser definida como uma resposta do corpo a estímulos nocivos. Embora o processo inflamatório seja um mecanismo de defesa do organismo, quando perdura por longos períodos, mediadores envolvidos nesse processo podem se perpetuar e agravar muitas doenças (ANDERSEN, 2015; KUMAR et al., 2016; LALRINZUALI; VABEIRYUREILAI; JAGETIA, 2016).

Desta forma, a inflamação em um contexto geral, acaba se tornando alvo de muitos estudos científicos por ser a base dos processos patológicos de um organismo. A produção de fármacos antiinflamatórios visa homeostase do indivíduo, afim de evitar os efeitos deletérios causados pela resposta inflamatória exacerbada. Geralmente a intervenção farmacoterapêutica química está aliada a efeitos deletérios secundários, dando força à pesquisa de compostos menos danosos ao organismo (ANDERSEN, 2015; KUMAR et al., 2016; LALRINZUALI; VABEIRYUREILAI; JAGETIA, 2016).

A busca crescente por produtos inovadores diversifica sua linhagem abrangendo o ramo da pesquisa, diversos ramos comerciais, área farmacológica e atividade biológica. A procura por meios menos custosos, acaba trazendo uma alternativa ao atual mercado de medicamentos, tornando a fabricação dos biocompostos mais acessível. O estudo visa testar o potencial antiinflamatório e antioxidante de uma nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro por aplicação tópica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Nanopartículas e Nanopartículas Metálicas

Nanopartículas (NPs) são atraentes materiais multifuncionais devido ao seu tamanho único, química e propriedades físicas. Elas têm propriedades físico-químicas definidas, como por exemplo propriedade ótica, propriedade magnética e propriedade catalítica. As nanopartículas têm melhor interação e biodisponibilidade se comparada com unidades de partículas maiores, garantindo a elas uma maior utilização e absorção por células individuais e órgãos (DARGO; AYALIEW; KASSA, 2017).

Com o incentivo ao aperfeiçoamento dos métodos químicos de síntese pela descoberta de novos efeitos físicos e químicos que surgem com a redução das dimensões metálicas, houve uma popularização, nas últimas três décadas, da pesquisa teórica e experimental realizada na área de Nanopartículas Metálicas (NPM) (VERDEIRO, 2014).

Vários avanços foram feitos nos últimos anos no que diz respeito à síntese de NPs, e isso tem aberto portas para inúmeras aplicações verídicas nos muitos campos da área da saúde, incluindo nanomedicina, ciências biomédicas e engenharia de materiais biológicos. A literatura sobre a produção e utilização das NPs em alguns ramos já é muito densa e bem investigada quando se refere às NPs de metal para polímeros, entre os quais ouro (Au), prata (Ag), sílica (Si) e cobre (Cu) foram extensivamente estudados e já são encontrados em várias aplicações, tais como catálise, detecção química, efeito nanocarreador para drogas e biomoléculas entrega de fármacos e princípios ativos (SUBBIAH; VEERAPANDIAN; YUN, 2010).

O potencial de aplicações biomédicas de NPs aumentaram nas últimas décadas devido à sua resistência a oxidação, propriedades ópticas e função apropriada como ligante químico e biológico. NPs de metal são bons veículos para o transporte de agentes terapêuticos e podem ser facilmente produzidas, assim como são potencialmente funcionais para tratamentos experimentais in vivo. Além disso, NPs com adição de polímeros são comumente biocompatíveis e podem servir como alvo de carregamento nanométrico com eficiente segmentação ativa (SUBBIAH; VEERAPANDIAN; YUN, 2010).

Para a maioria dos fenômenos que ocorrem na superfície de uma partícula com diâmetro menor que 10 nm, a leis da física clássica não se aplicam, resultando então

em diferentes propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas. Os efeitos mecânico-quânticos são observados quando determinado comprimento de onda dos elétrons de valência é da mesma ordem do tamanho da partícula. Por vez, a forma, tamanho, composição, cristalinidade e estrutura das nanopartículas afetam suas propriedades físico-químicas, por isso é indispensável que se desenvolvam métodos de produção que permitam controlar tais parâmetros (ALTAVILLA; CILIBERTO, 2011).

A dimensão da matéria não é o único critério para sua caracterização, e observação das propriedades físico-químicas que as diferencia das expressões de partículas maiores. Um exemplo disso é a prata que enquanto sólido estendido, de tamanho micro ou macroscópico, exibe coloração acinzentada. Por outro lado ela exibe diferentes colorações, dependentes do tamanho, em escala nanométrica. A coloração diferente é atribuída ao efeito plasmon ressonante. Isso se baseia na concentração de átomos na superfície. As nanopartículas metálicas podem apresentar uma banda pronunciada na região do UV-Vis que é atribuída a oscilação coletiva dos elétrons de condução provocada pela excitação óptica após a interação com o campo eletromagnético, para uma partícula esférica, evidenciando o deslocamento dos elétrons de condução provenientes das NPs (SILVA, 2015).

Uma das principais características de nanopartículas esféricas é a simetria. Esse tipo de partículas exibirá apenas uma banda SPR, visto que todos os modos dipolares possíveis são degenerados. Conforme a mudança de forma das NPsM, a complexidade do espectro aumenta dado aparecimento de outras bandas relativas à oscilação dos elétrons ao longo dos eixos das partículas. Com base neste conhecimento, a espectroscopia da região do UV-Vis torna-se uma técnica bastante útil para a avaliação preliminar da forma e tamanho médio de NPsM, assim como sua presença em formação de uma solução coloidal (SILVA, 2015).

2.2. Nanopartículas de Prata (AgNPs)

A utilização de íons prata no tratamento de doenças infecciosas é algo bastante antigo. Relatos de cerca de 1000 a. C. apontam que recipientes para armazenar água eram constituídos de prata, mantendo assim a água pura, em manifestações de microrganismos. De forma complementar ao uso de utensílios de prata, devido ao seu alto custo, iniciou-se a busca por alternativas para a exploração desse efeito

bacteriano. A partir de então surgiu o interesse pela incorporação de nanopartículas de prata a outros materiais (RATYAKSHI; CHAUHAN, 2009).

As nanopartículas de prata apresentam coloração amarelada com uma banda intensa na faixa de 380-420 nm e outras em comprimentos de onda maiores do espectro eletrônico de absorção (KAPOOR et al., 1998).

Essas AgNPs são uma nova geração de produtos, com aplicações biomédicas, pois além de atraírem interesse por sua eficácia comprovada na atividade antibacteriana, recentemente foi demonstrado que possuem efeito anti-inflamatório. Essa atual função foi evidenciada a partir de pesquisas que comprovaram, com sua aplicação, a melhora na cicatrização de feridas, sendo constantemente explorada na fabricação de curativos melhores, direcionados a queimados (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010).

Dentre suas funções diversas, a prata é conhecida há muito tempo por possuir propriedades antibacterianas, inclusive atualmente sua função de acelerar a cicatrização de feridas, aborda seu potencial anti-inflamatório. Essa atividade tem sido usufruída ao longo da história, a partir de Hipócrates, com o marco no tratamento precoce de úlceras e tratamento para infecções gonocócicas em recém-nascidos. O interesse pela prata foi motivado pelo surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos, porém, seu uso foi severamente limitado pela ação lesiva de seus íons aos seres humanos. No entanto, a nanotecnologia, com seu caráter inovador, proporcionou a produção de partículas de prata menores, com área de superfície de contato muito maior, o que proporcionou estabilidade ativa aos efeitos benéficos dos compostos (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010).

2.3. Síntese de nanopartícula de prata

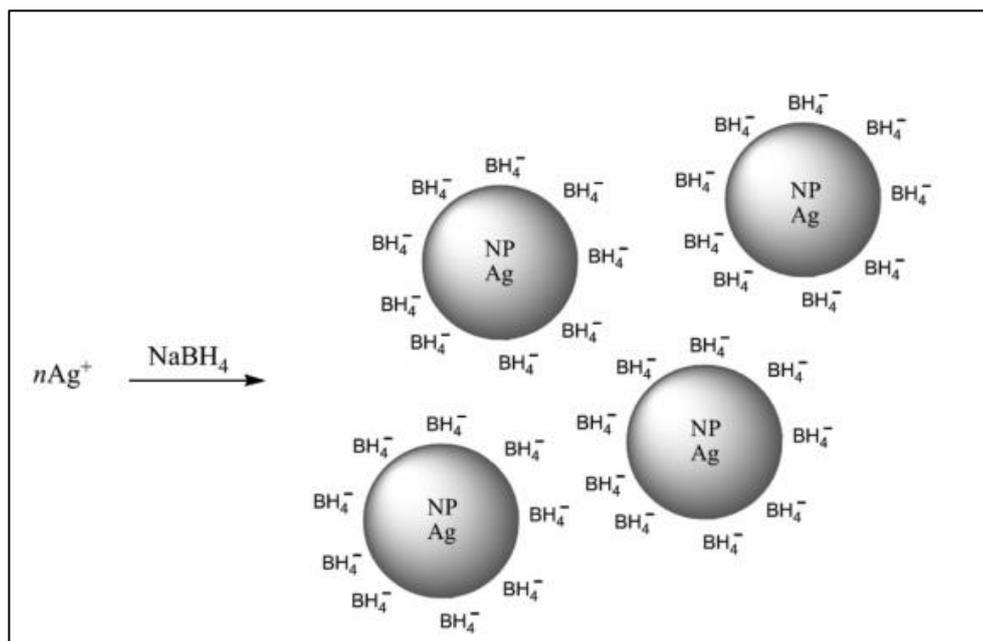
O método químico pode produzir com sucesso nanopartículas puras e bem definidas, além disso é também o método mais comum devido à sua conveniência e equipamento simples. Métodos químicos proporcionam uma maneira fácil de sintetizar AgNPs em solução, porque eles podem ser implementadas sob condições simples, suaves e favoráveis. Na abordagem química, a preparação de dispersões coloidais de AgNPs em água ou solventes orgânicos é realizada por redução química. A

redução de íons de prata em solventes produz nanopartículas de prata coloidal com diferentes partículas diâmetros (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015).

Geralmente, o processo de síntese química de AgNPs emprega três componentes principais: (1) precursores metálicos, (2) agentes redutores e (3) agentes estabilizadores / limitantes. A redução química é o método mais comum por causa de sua fabricação e aparato simples. As propriedades intrínsecas das AgNPs sintetizadas são determinadas pelo seu tamanho, forma e estrutura cristalina, que pode ser controlado durante a síntese química, sendo que o tamanho e distribuição AgNPs são influenciados por agentes redutores e estabilizadores (NATSUKI; NATSUKI; HASHIMOTO, 2015).

Assim que são formados, os átomos metálicos passam por processo de nucleação e posterior crescimento para só depois resultar em nanopartículas. As nanopartículas metálicas possuem alta energia superficial o que promove a agregação destas partículas por ligação metal-metal. Assim se faz necessária a estabilização deste sistema e as rotas clássicas utilizam como agentes redutores os íons citrato, borohidretos e hidrazina. Como pode ser evidenciado na Figura 1, abordando o processo de formação e estabilização de nanopartículas por borohidreto (KHEYBARI et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2012; JR et al., 2012).

Figura 1. Esquema mostrando a preparação de nanopartículas de prata (AgNP) contendo íons borohidreto adsorvidos, que criam forças repulsivas capazes de estabilizar a solução coloidal.



Fonte: JR. et al., 2012.

No estudo de Cardoso et al. 2014, foi sintetizada quimicamente e caracterizada uma nanopartícula de prata e colágeno (AgNPcol), onde foi comprovado que seu pequeno tamanho e carga positiva, a penetrava facilmente nas membranas das bactérias. Foi então evidenciado que, a partícula de prata manteve suas propriedades antimicrobianas mesmo quando incorporada às nanopartículas estabilizadas com colágeno. Já em 2016, Cardoso e seus colaboradores testaram o efeito anti-inflamatório da AgNPcol in vivo, evidenciando seu potencial reversor da inflamação, mas sem muitas análises específicas.

A biocompatibilidade e a biodegradabilidade geralmente são problemas na utilização de polímeros sintéticos nos tecidos aplicados (BURG; PORTER; KELLAM, 2000). Por isso o estudo de novos materiais tem sido baseado na mistura de dois ou mais polímeros ou biopolímeros, onde soluções destes são misturadas em diferentes proporções obtendo-se, muitas vezes, materiais com propriedades distintas das de seus precursores. Entre esses biomateriais destacam-se os estudos com colágeno (CEN et al., 2008).

2.4. Colágeno

A palavra colágeno é derivada do termo grego, em que KOLLA (cola) e GENO (produção), seu significado mais usual seria a produção de cola animal, a partir de diferentes matérias-primas. O colágeno corresponde a 1/3 do total de proteínas dos vertebrados, estima-se que em mamíferos varia entre 20 a 30% dessa proteína corpórea. Classificada como a mais antiga cola do mundo, o colágeno era obtido pelo aquecimento da pele e tendões de cavalos, bovinos e outros animais, já sendo utilizado como adesivo pelos egípcios a cerca de 4.000 anos atrás e por outros povos como revestimento protetor sobre tecidos bordados, cestas de corda, e confecção de instrumentos musicais (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2001; SARCINELLI et al., 2007; BORDIGNON, 2010).

É uma proteína fibrosa caracterizada por grande diversidade biológica e ampla força de tensão. Sua principal função no músculo é suportar as fibras musculares, onde para se produzir movimento, promove a transmissão da força contráctil das unidades miofibrilares ao esqueleto. Esta variedade na composição de sua estrutura e função pode ser observada nas formas em que o colágeno se apresenta como

componente, como por exemplo: na presença de fibras colágenas nos tendões, fibras entrelaçadas formando camadas flexíveis na pele, películas transparentes de fibras finas na córnea, estrutura de membrana amorfa presente na cápsula e nos glomérulos renais, na lubrificação de cartilagem das articulações, presença de colágeno mineralizado no osso, na dentina e filamentos finos circundando e suportando as células; promovendo então, elasticidade e resistência à pele, aos músculos, tendões, ligamentos, distribuindo fluidos nos vasos sanguíneos e linfáticos, auxiliando na deposição mineral nos ossos, dentre outros (RODRIGUES, 2009).

O interesse acerca das propriedades funcionais do colágeno está nos muitos e recentes estudos que abrangem todas as áreas do conhecimento, inclusive os de seu uso como matriz estabilizante, porém, sem associações de outros polímeros, ainda mais, associado ao potencial anti-inflamatório (JUNQUEIRA, 2008; RODRIGUES, 2009).

2.4.1. Colágeno Hidrolisado

O colágeno hidrolisado é extraído da pele ou de ossos de animais devidamente inspecionados, em água de 50 a 60 °C ou utilizando-se enzimas. Trata-se de uma proteína natural derivada do colágeno nativo. A diferença em relação ao colágeno em sua forma “bruta” é que estas proteínas são solúveis em água (alta capacidade de retenção hídrica) ou em salmoura e apresentam elevado conteúdo proteico (84 a 90%) (PRESTES, 2013).

O colágeno hidrolisado possui menor peso molecular, mantendo uma composição de aminoácidos, que é idêntica à do colágeno, fornecendo assim altos níveis de glicina e prolina, dois aminoácidos essenciais para a estabilidade e regeneração da cartilagem. Uma vez liberados, esses peptídeos constituintes do colágeno podem afetar funções fisiológicas do corpo e proporcionam múltiplos benefícios para a saúde, aplicações nutricionais ou farmacêuticas (COMBLAIN et al., 2015).

Algumas das características do colágeno que favorecem o seu uso como biomaterial são: ser uma das proteínas mais conhecidas química e estruturalmente, apresentando baixo índice de alergenicidade; ser biocompatível; poder ter sua estrutura química e suas propriedades modificadas; possuir grande resistência à tração e baixa elasticidade; poder servir como matriz de liberação de fármacos; ter habilidade de suportar e induzir o crescimento celular; ser um material que pode ser

trabalhado em diversas formas, como gel, membranas, soluções e ser biodegradável (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Um estudo recente de Cardoso et al. 2017, utilizou colágeno como matriz estabilizante, associado a prata. Desta forma, foi produzida uma nanopartícula de prata e colágeno, sendo constatado por experimento in vivo e in vitro, seu potencial anti-inflamatório e atividade contra microrganismos, comparando apenas à atividade dos compostos isolados. Procurar por estabilizantes ou outros compostos para produção de materiais bioabsorvíveis e eficazes é uma forma de contornar o problema da produção de fármacos sintéticos e não rentáveis. Associar as propriedades de polímeros naturais ou biocompostos através da mistura química experimental, onde soluções destes são misturadas em diferentes proporções obtendo-se, muitas vezes, materiais com propriedades distintas das de seus precursores, faz com que as blendas poliméricas de polímeros naturais e biocompostos representem uma classe de materiais que tem atraído grande atenção na área de bioaplicação, devido a variedade das formas que podem ser obtidas e comprovação de efeitos potentes e inovadores.

2.5. Goma do Cajueiro

As gomas são polímeros naturais, formados por unidades de monossacarídeos em arranjos lineares ou ramificados, pertencentes à classe dos carboidratos e de alta massa molar. Isso significa que possuem estruturas químicas de elevado peso molecular, sendo: hidrofílicas, inodoras, insípidas, não tóxicas, com propriedades coloidais, produzindo, em solventes, suspensões altamente viscosas, com funções espessantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e aglutinantes. Apresentam também, capacidade de controle de cristalização, encapsulação e formação de filmes (LIMA et al., 2001; CARVALHO et al., 2013).

O polissacarídeo exsudado do cajueiro apresenta diversas aplicações como suporte para microcápsulas, exibe potencial anti-inflamatório, efeitos antinociceptivos e gastroprotetor. A goma do cajueiro ainda apresenta atividade contra o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas, sua modificação resulta em hidrogéis com caráter superabsorvente, podendo ser utilizado para o condicionamento do solo e foi utilizada na forma de emulsão como agente anti-inflamatório no processo cicatricial de camundongos, sendo possível observar que a resolução do processo inflamatório

foi favorecida, do ponto de vista histopatológico (SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2015).

A forma de obtenção das gomas naturais é partir do exsudato de árvores, sementes, algas ou por fermentação microbiológica. A fim de alterar ou aprimorar alguma propriedade desse material, são realizadas modificações, onde o exsudato dos vegetais funciona como um mecanismo de defesa contra agressões físicas ou biológicas. Geralmente são heteropolissacarídeos complexos, ramificados e polidispersos (CUNHA, DE PAULA, & FEITOSA, 2009).

Devido a diversidade de informações referentes a goma do cajueiro, um ramo em ascensão é a utilização de nanopartículas obtidas a partir de polissacarídeos, ou associadas a eles para aplicação em liberação de ativos farmacológicos (ABREU et al. 2012; LOPES et al. 2014; GURMAN et al. 2015).

2.6. Inflamação

Todos os organismos vivos, desde um organismo unicelular, procarionte, como as bactérias ao mais complexo mamífero, como o ser humano, possuem um sistema de reações endógenas capazes de responder a estímulos lesivos. Além disso, esse mecanismo é responsável pelo equilíbrio do organismo agredido. Nos vertebrados, a resposta deste sistema envolve a fisiologia, bioquímica e imunologia do organismo e é denominada de inflamação (VOLTARELLI, 1994).

Fisiologicamente a inflamação é um processo decorrente da ativação de uma cascata de reações que alteram os componentes humorais e celulares após um dano tecidual. Em contato com um agente lesivo, gera um direcionamento de células circulantes nos vasos sanguíneos, que são direcionadas por substâncias quimiotáticas na região ou sítio inflamatório. Como característica cardinal da inflamação, sinais clínicos se expressão através de cinco denominações: dor, calor, rubor, edema e perda de função. Esses sinais são consequência de uma alteração nos vasos sanguíneos podendo ser exemplificado com a contração da musculatura lisa endotelial, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Todas essas características levam a um extravasamento de fluido proteico para o interstício e em seguida infiltrado celular (CRUVINEL et al., 2010, SERHAN, 2004).

Mediadores pré e pró-inflamatórios originários do exsudato e do infiltrado celular durante a inflamação, possuem grande importância terapêutica, podendo ser

inibidos ou estimulados, permitindo, com isso, o controle dos sinais e sintomas do processo inflamatório (CHAMUSCA et al., 2012). Enquanto isso, tipos celulares, como os leucócitos, envolvem-se nesse processo por meio de atividades imunes e alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas. Tal recrutamento de leucócitos e proteínas do plasma estão a mercê do estresse e mau funcionamento do tecido, induzindo uma resposta que também se baseia em macrófagos teciduais residentes e faz mediações entre o estado homeostático basal e uma resposta inflamatória clássica. Desta forma, a inflamação é algo natural do organismo, porque como resposta adaptativa do organismo, tem função principal de restaurar a homeostase tecidual (BALBINO et al., 2005; MEDHITOV, 2008).

Existem alguns fatores, como a tempo de duração e características patológicas, que podem dividir a inflamação em duas categorias principais: aguda e crônica. Aguda caracteriza-se por ser de curta duração (horas a dias) e acontece imediatamente como resposta ao estímulo do agente agressor. Para que ocorra essa resposta, vários mediadores promovem vasodilatação como óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas, causando aumento da permeabilidade vascular, os que vai favorecer através da exsudação plasmática, a passagem de líquidos, proteínas (evento vascular) e com isso a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos nessa fase celular) (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

Como evolução, a inflamação aguda passa para um quadro de cronicidade, onde a recorrência do evento inflamatório que se estende por semanas a meses, tem a infiltração de células mononucleadas como macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Daí então, um ciclo lesivo perdura, deixando um quadro de presença de infiltrado inflamatório ativo, ação reparadora local e com conseqüente formação de fibrose (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDHITOV, 2008).

Com o tempo a persistência do estímulo inflamatório exacerbado ou desregulado e de toda cascata de reações que medeiam e intervêm esse processo, pode ser extremamente prejudicial ao organismo. Esse processo está relacionado a muitas doenças crônicas como as cardiovasculares, artrite, asma e muitas vezes processos cancerígenos, tornando a inflamação, a base de enfermidades dos indivíduos (LALRINZUALI et al., 2016).

2.6.1. Fase Vascular da inflamação

Há nessa fase a quebra do fluxo laminar sanguíneo, formação de edema, aumento da permeabilidade vascular de capilares e vênulas por mediadores inflamatórios, como resultado da liberação de aminas vasoativas como histamina, bradicinina, serotonina, leucotrienos, produtos do sistema complemento e de coagulação, fator de agregação plaquetária (PAF), dentre outros. Desta forma, os mediadores de origem celular também contribuem de forma marcante para a indução de vários sinais e sintomas associados à inflamação, caracterizando as típicas atribuições de dor, calor, rubor, edema e perda de função. Esses mediadores pertencem a diferentes grupos químicos (aminas, cininas, lipídicos, aminoácidos, proteínas...), podendo ser encontrados pré-formados e armazenados em grânulos intracelulares ou serem produzidos sob demanda. Os seus efeitos resultam da interação com enzimas ou receptores específicos. (CRUVINEL et al. 2010).

No processo inflamatório inicial, há um estímulo para que as células teciduais deem início a uma fase vascular, onde há vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas, histamina e serotonina liberadas por mastócitos e monócitos. No início, eletrólitos e pequenas moléculas saem do leito capilar constituindo o transudato, só depois, moléculas maiores permeiam o vaso, como albumina e fibrinogênio, para constituir o exsudato rico em proteínas e água. Além disto, o endotélio ativado passa a expressar moléculas de superfície que favorecem a aderência e migração de leucócitos para o tecido. A ativação do sistema local, torna a dinamicidade das reações propícia para que moléculas de adesão sejam expressas, onde os leucócitos poderão se ligar a receptores endoteliais específicos e enfim, migrar para o tecido com o alvo inflamatório. Também são ativados macrófagos teciduais, os quais liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- α e quimiocinas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Histamina e Serotonina, são duas aminas disponíveis em reservas pré-formadas e estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação. A histamina está distribuída de forma vasta nos tecidos, e sua fonte mais rica são os mastócitos, que estão normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos, mas pode ser encontrada, também, em basófilos e plaquetas. A histamina, em seres humanos, é considerada o principal mediador da fase imediata de aumento de permeabilidade vascular, ao produzir lacunas no endotélio venular causando aumento da permeabilidade vascular dessa estrutura. A serotonina é um segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes

às da histamina. A bradicinina é um potente agente que aumenta a permeabilidade vascular, causando também a contração do músculo liso e dilatação dos vasos sanguíneos (SJOERDSMA; WAALKES; WEISSBACH, 1957; KUSHNIR-SUKHOV et al., 2007; SIKANDER; RANA; PRASAD, 2009; STEINER, 2011; ARREOLA et al., 2015).

Mediadores lipídicos também são produzidos. Estes mediadores são derivados do ácido araquidônico; assim como outros eicosanoides e são produzidos em consequência da ativação de fosfolipases que clivam fosfolipídios constituintes da membrana celular, gerando prostaglandinas, leucotrienos e PAF (fator de ativação plaquetária). As prostaglandinas produzidas têm funções inflamatórias que induzem a febre, a hiperalgesia e a vasodilatação. Cicloxigenase (COX) ou endoperóxido de prostaglandinasintase (PGHS) é a enzima chave na síntese de prostaglandinas de seu precursor, o ácido araquidônico. Diferencia-se em COX-1 que tem um papel fisiológico, sendo importante por seu papel como protetora da mucosa gástrica, agregação de plaquetas, controle pressórico arterial e excitabilidade neuronal, por exemplo. Tem-se ainda, a COX-2 atuante durante o processo inflamatório, sendo importante para a produção dos eicosanóides que contribuem para vários sinais e sintomas associados à inflamação (BOTTING, 2006).

A figura 3 mostra as principais manifestações locais da inflamação aguda comparadas com o normal: (1) Dilatação vascular e aumento do fluxo sanguíneo (causando rubor e calor); (2) Extravasamento de líquido e proteínas plasmáticas (edema); (3) Emigração e acúmulo de leucócitos no local de lesão (principalmente neutrófilos). Fonte: Cotran, Kumar, Collins (2000).

2.6.2. Fase celular da inflamação

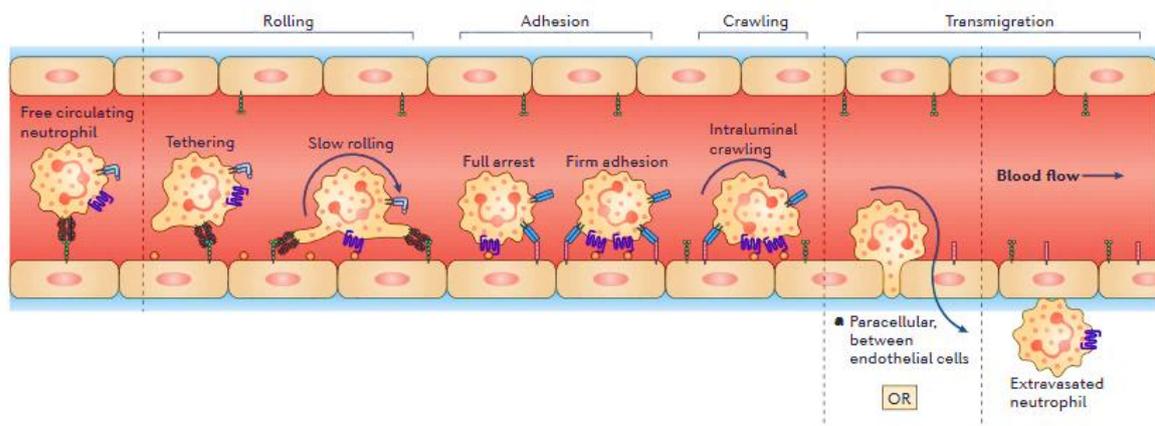
O processo inflamatório, tem como destaque em sua fase vascular a migração de células de defesa para o local da lesão, principalmente de neutrófilos. A função neutrofílica é essencial como uma primeira linha de defesa contra patógenos invasores, que além de produtor de quimiocinas, têm uma variedade de efeitos, inserindo expressão da molécula de adesão, quimiotaxia e ativação de outras vias inflamatórias. Na destruição do patógeno, alguns mecanismos efetores podem ser citados como fagocitose, liberação de enzimas antimicrobianas ou fatores tóxicos e

aumento na produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (THOMAS; SCHRODER, 2013; PACHER et al. 2007; OSTUNI et al. 2016; SAYERS, RD, 2002).

A capacidade fagocitária dos neutrófilos é estimulada pela ligação de seus receptores que são agentes determinantes da passagem endotelial para o meio intersticial. Essas células também sofrem degranulação, liberando três classes de grânulos no meio extracelular, as quais: 1. Grânulos primários ou azurófilos, que contêm mediadores importantes como mieloperoxidase (MPO), defensinas, elastase neutrofílica, proteína de aumento da permeabilidade bacteriana e catepsina G. 2. grânulos secundários, que apresentam componentes secretados especificamente por neutrófilos, sendo a lactoferrina o principal exemplo. 3. Grânulos terciários, cujas principais proteínas são as catepsinas e gelatinases (CRUVINEL et al., 2010)

A migração leucocitária (neutrófilos) acontece com a ativação do endotélio, permitindo o extravasamento seletivo denominada marginação. As selectinas permitem a adesão fraca dos neutrófilos, as integrinas promovem a adesão forte, possibilitando a adesão do leucócito ao endotélio e as quimiocinas ativam e estimulam a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. Estas interações fazem com que os neutrófilos rolem pela parede do vaso e sejam expostos aos fatores quimiotáticos. O gradiente quimiotático crescente direciona a migração dos neutrófilos ao sítio inflamatório (MESQUITA JR et al, 2008; MCEVER, 1991).

Figura 2. Migração de célula leucocitária para o meio intersticial.



Fonte: Kolaczowska; Kube, 2013.

Os radicais livres são átomos ou moléculas que têm elétrons desemparelhados, geralmente instáveis e altamente reativo. No sistema de biologia, existem dois tipos de radicais livres, radicais baseados em oxigênio e radicais baseados em nitrogênio, sendo que radicais livres de oxigênio, como superóxido, radicais hidroxila e radicais peroxila, peróxido de hidrogênio, são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS), que são geradas durante o processo de metabolismo do oxigênio. EROS incluindo radicais livres de nitrogênio e não radicais, como o nitrogênio dióxido de enxofre, óxido nítrico (NO) e peroxinitrito, são derivados da via do NO. Devido às suas características químicas especiais, EROS podem iniciar dano à membrana plasmática através da peroxidação lipídica, causando quebras nos filamentos de DNA e oxidando indiscriminadamente todas as membranas e tecidos biológicos, resultando em lesões. No entanto, uma vez que o corpo é capaz de remover as EROS até certo ponto, essas espécies reativas não são necessariamente uma ameaça ao corpo sob condições fisiológicas. Quando EROS são excessivas, haverá uma perturbação da homeostase, resultando em estresse oxidativo, que desempenha um papel crítico em lesões e desencadeamento de lesões teciduais graves, outras doenças crônicas e desordens degenerativas (LI et al., 2015).

A maioria, se não todos os componentes celulares, são suscetíveis à ação das EROS frente ao estresse oxidativo, entretanto a estrutura que mais sofre danos é a membrana celular, em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Tal ação, gera produtos da peroxidação lipídica, como o ácido malondialdeído (MDA), que faz menção e serve como marcador do efeito dos radicais livres no organismo. O MDA possui ação tóxica aos genes, citoplasma e componentes plasmáticos, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo, sendo a quantificação de MDA nos sistemas biológicos um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; DEL RIO, STEWART, PELLEGRINI, 2005; ÖZGÜNER et al., 1999; PILZ, MEINEKE, GLEITER, 2000; SIM et al., 2003).

Naturalmente no organismo, existe o sistema antioxidante que é essencial para lidar com a resposta celular diante do estresse oxidativo, sob condições fisiológicas. Em condições normais, os níveis de EROS são baixas, o aumento da produção de EROS simultaneamente à inibição de sistemas anti-oxidantes e / ou de complexo CTE (cadeia de transporte de elétrons) aumenta os níveis de EROS, alterando a ação

do sistema antioxidante. Portanto, enzimas antioxidantes como catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD), receptores de elétrons não enzimáticos, como a glutathione (GSH), são afetados pois compõem a defesa antioxidante e usados como índices para avaliar o nível de estresse oxidativo (LI et al. 2015; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

2.7. Estresse oxidativo

A presença de radicais livres têm sido correlacionada com um grande número de doenças, indicando que estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos. As espécies de radicais que estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; DREHER; JUNOD, 1996; GROOTVELD; HALLIWELL, 1999).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo (KOLACZKOWSKA; KUBE, 2013).

2.8. Fármacos antiinflamatórios

A inflamação representa um papel importante no reparo e busca da homeostase, entretanto, quando há uma resposta exacerbada prejudicial ao organismo, se faz necessária a intervenção medicamentosa com o uso de anti-inflamatórios. Com duas categorias, amplamente descritas na literatura, é possível citar duas categorias de fármacos para reversão de desordens inflamatórias: os

glicocorticoides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que são fármacos capazes de interferir neste processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto. (COUTINHO et al, 2009; SILVA et al., 2015; VAN ESCH, 2013).

Os glicocorticoides são esteroides lipofílicos. Esta classe de medicamentos possui um amplo espectro de indicações terapêuticas, desde sua descoberta em 1940, quando eram direcionados para tratamentos que quadros inflamatórios, inclusive alguns tipos de câncer. Pode-se dizer que desde então, passando para o século XXI, a linha de aplicação permanece a mesma, sendo a principal indicação a de imunomodulação ou de tratamento anti-inflamatório. Esses direcionamentos foram atribuídos, devido sua atuação repressiva de genes pró-inflamatórios através da interação direta de receptores de glicocorticoides, aliados a fatores de transcrição (LONGUI, 2007; CRUZ-TOPETE; CIDLOWSKI, 2015).

Como um grupo bem diversificado, os AINEs representam em sua maior parte são ácidos orgânicos com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória. Estes medicamentos agem interferindo na síntese de prostaglandinas, inibindo as enzimas COX (síntese de COX-1 e/ou COX-2), com conseqüente diminuição da produção de prostaglandinas e combate a inflamação, a dor e a febre (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006; SOSTRES, 2010; VONKEMAN; VAN DE LAAR, 2010; SILVA et al., 2015; VAN ESCH, 2013).

Com ação eficaz sobre processos inflamatórios, esses medicamentos se consumidos ou administrados por período prolongado, podem causar efeitos colaterais, não só prejudiciais ao organismo, mas também que causam interrupção em certos tipos de tratamento. Na corticoterapia, os efeitos estão relacionados ao tempo de tratamento e uso de glicocorticoides de ação mais prolongada, gerando uma série de implicações em uma variedade de como: endócrino-metabólico, imunológico e cardiovascular. Também relacionado a tratamentos mais duradouros, os efeitos colaterais podem acarretar em esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal (LONGUI, 2007; HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006; SILVA et al., 2015).

Diante do conteúdo exposto, apesar da principal abordagem terapêutica ser com o uso destes fármacos; os efeitos colaterais são em grande incidência nos usuários destes medicamentos, tornando necessário o teste de novas opções terapêuticas viáveis e menos agressivas ao organismo.

3.OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antiinflamatória e antioxidante de uma nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma do cajueiro (AgNPcol+gc) por aplicação tópica em camundongos Swiss.

3.1. Objetivos Específicos

- Identificar a concentração ideal de AgNPcol+gc para uso em modelo experimental;
- Comparar o efeito antiinflamatório da AgNPcol+gc diante de seus compostos isolados
- Determinar a atividade antiinflamatória da AgNPcol+gc em modelo de edema de pata em camundongos induzido por carragenina, histamina, composto 48/80 e PGE2;
- Averiguar a ação da AgNPcol+gc na migração neutrofílica no edema de pata através da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO);
- Averiguar a ação da AgNPcol+gc sobre a permeabilidade vascular em camundongos;
- Investigar o potencial antioxidante do AgNPcol+gc sobre os níveis de glutathiona (GSH), Nitrito e Superóxido desmutase (SOD) no líquido peritoneal.

4. METODOLOGIA

4.1 Drogas e Reagentes

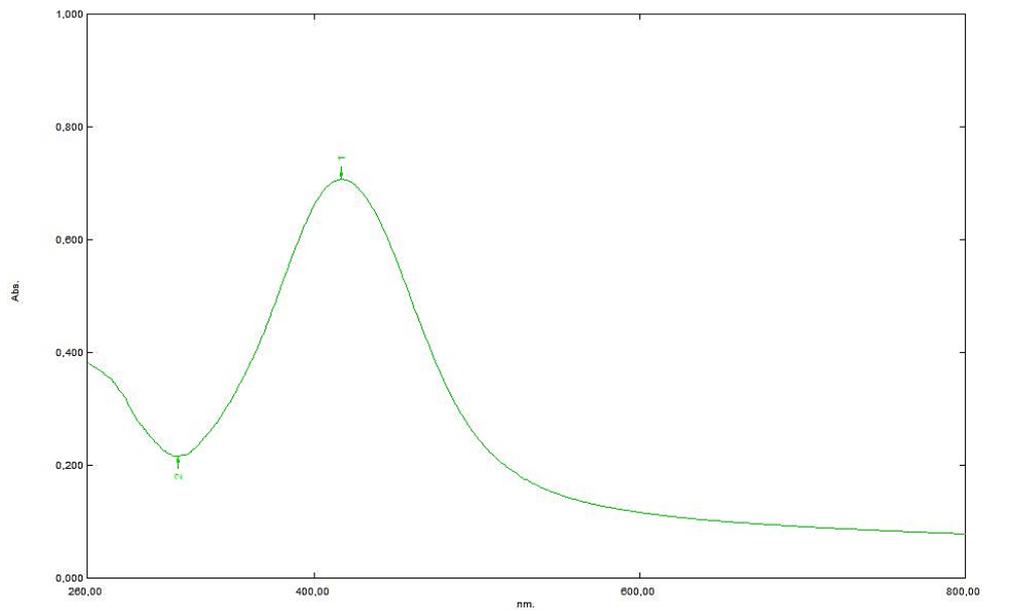
λ -Carragenina, indometacina, histamina e composto 48/80 foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). Todas as drogas foram dissolvidas em 0,9% estéril (p / v NaCl (solução salina). Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.2 Preparação da Nanopartícula de prata, colágeno e goma do cajueiro

Para a síntese da nanopartícula de prata estabilizada com colágeno e goma de cajueiro foram necessárias uma solução de Nitrato de prata (AgNO_3) (concentração de 1 mM), uma solução de polímero de cajueiro (concentração de 0,3%), uma solução de colágeno hidrolisado (concentração de 0,3%) e uma solução de borohidreto de Sódio (NaBH_4) (concentração de 0.1 mol/L).

A síntese da $\text{AgNP}_{\text{col+gc}}$ utilizou o método de Cardoso et al. (2017), modificado. Inicialmente foram adicionadas partes iguais da solução de colágeno e da solução da goma de cajueiro. Depois de um período de homogeneização o volume presente foi dobrado com a solução de AgNO_3 . Esta solução ficou em agitação a 150 rpm por 15 min e protegido da luz. Em seguida, foi adicionado uma solução de NaBH_4 gelada, em forma de jato rápido. Foi observado a mudança de coloração da solução, passando a uma cor acinzentada/ âmbar, característica da formação de nanopartículas. Para finalizar foi colocada uma amostra de 1ml em cubeta de quartzo no espectrofotômetro de Uv-vis e feita a medida dentro do comprimento de onda de 100 a 1000, a banda característica da AgNPs na região de 420 nm significou sucesso na fabricação (gráfico 1) (Composto foi obtido em parceria com a Prof^o Dra. Durcilene Alves da Silva / BIOTEC / UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ).

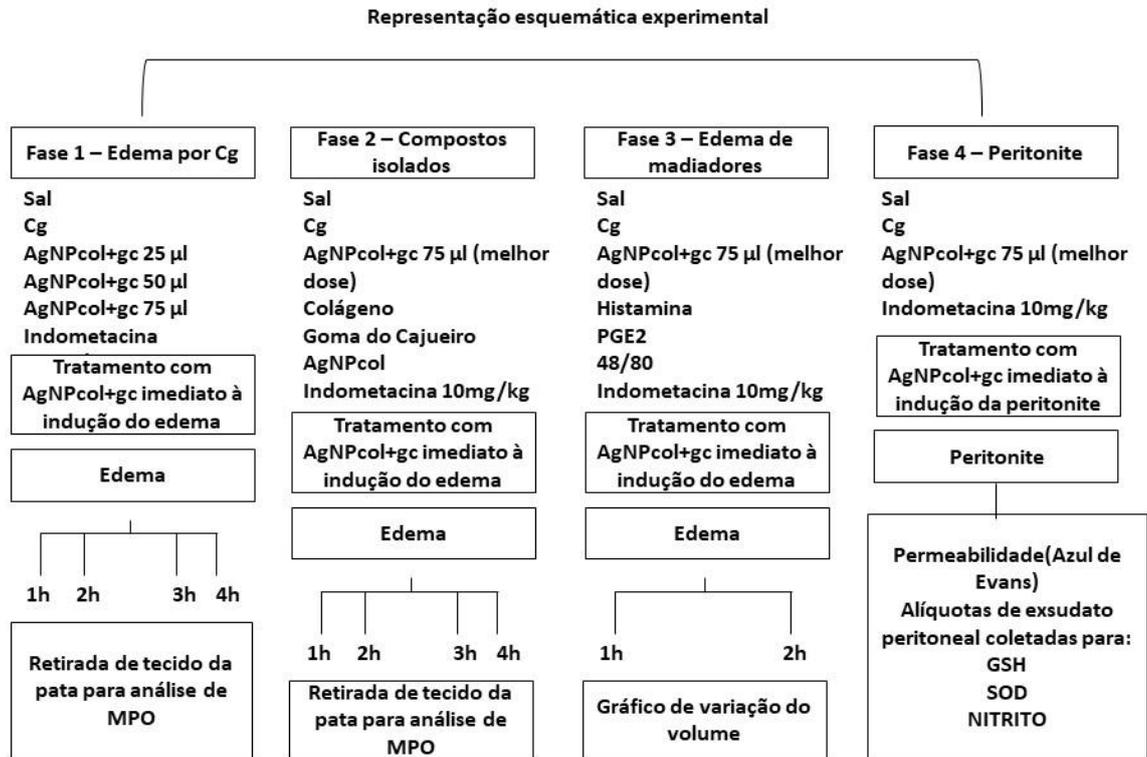
Figura 3. Gráfico da banda característica da formação de AgNPs (pico de absorção 415 nm).



Fonte: Autoria própria

4.3 Esquema geral procedimento experimental

Figura 4. Representação esquemática do processo de avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante da AgNPcol+gc



Fonte: do autor

4.4 Animais Experimentais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, pesando entre 25-30g, de ambos os sexos (n=5 por grupo). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí, Teresina. Foram então armazenados, e mantidos em gaiolas com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, com livre acesso a ração (dieta padrão) e água ad libitum. Todos os procedimentos e cuidados foram conduzidos de acordo com as normas internacionais aceitas e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (COBEA) em consonância com a resolução normativa N° 38, 17 de abril de 2018 da lei n° 11.794. Esse projeto foi enviado para

apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI e foi aprovado pelo (protocolo nº295/17) (anexo 1). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.5 Indução de edema de pata por carragenina e bases de tratamento – Curva dose resposta

Inicialmente, a curva dose-resposta, foi feita com a aplicação da AgNPcol+gc. Foram utilizados 9 grupos de 4 a 5 animais, para análise de edema de pata induzido por carragenina e será avaliado o deslocamento de volume de líquido no pletismômetro. Os outros grupos são o de controle negativo (carragenina), controles positivos (salina e indometacina), com aplicação injetada diretamente na pata, e grupos teste isolados (colágeno, goma do cajueiro e AgNPcol), topicamente. Foram utilizadas 3 doses de AgNPcol+gc referenciadas pelo estudo de Cardoso e cols. em 2017 (25 µl, 50 µl e 75 µl), aplicadas com espátula por todo perímetro da pata em tratamento, simulando movimentos de “pinceladas”. Desta forma, os animais foram distribuídos de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Grupos avaliados na curva dose resposta em 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: AgNPcol + gc (Dose 1) 25 µl
G5: AgNPcol + gc (Dose 2) 50 µl
G6: AgNPcol + gc (Dose 3) 75 µl
G7: AgNPcol 50 µl
G8: Solução de colágeno hidrolisado 0,3%
G9: Solução com goma do cajueiro 0,3%

O G1 recebeu 50 µl de salina estéril (0,9 %), nos demais grupos, o edema foi induzido pela administração de 50 µl de uma suspensão de carragenina (500 µg/pata) diluída em solução salina estéril a 0,9%, na pata traseira direita. O G2 não foi tratado.

O grupo com indometacina (G3) recebeu a solução de tratamento (10mg/kg) 30 minutos antes da indução do edema. Os grupos AgNPcol+gc (G4, G5, G6 e G7) foram tratados com nanopartículas em doses já descritas, por pinceladas. Os G8 e G9 tiveram tratamento conforme os grupos AgNPcol+gc.

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). Após a 4ª hora os animais sofreram eutanásia e amostras da pata foram colhidas para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A melhor dose assumirá a nomenclatura de AgNPcol+gc (T).

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

$$\% \text{inibição do edema} = \frac{(V_t - V_0)_{\text{controle}} - (V_t - V_0)_{\text{tratado}}}{(V_t - V_0)_{\text{controle}}} \times 100. \text{ Em que } V_0 \text{ é o volume}$$

basal e V_t é o volume final mensurado nos tempos ja indicados.

4.6 Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios

Será feito o edema com diferentes agentes flogísticos para análise do mecanismo de ação das nanopartículas, serão aplicados 50 µl de todos os agentes, um por vez em diferentes rodadas de experimentos, nas concentrações a seguir, histamina (HIST; 100 µg/pata), ou prostaglandina E2, (PGE2; 3 nmol/pata), composto 48/80 (12 µg/pata) ,como adaptado por direita Silva et al., 2015. Nesses edemas o volume da pata será analisado 30 minutos após a indução, e em intervalos de 30 minutos por duas horas. Os animais serão distribuídos em 4 grupos por experimento e 5 animais por grupo. Um grupo receberá ainda 50µl de solução salina estéril a 0,9% para servir de grupo controle não tratado.

Tabela 2. Grupos utilizados durante o edema de mediadores inflamatórios

G1: Solução salina estéril a 0,9%
G2: Mediador
G3: Indometacina 10 mg/kg
G4: AgNPcol + gc 75 µl (melhor dose)

4.7 Modelo de peritonite induzida por carragenina

Para indução de peritonite segundo Silva et al. (2013), a inflamação será induzida com carragenina na cavidade intraperitoneal (i.p.) (250 µl; 500 µg/cavidade), onde o grupo AgNPcol+gc primeiramente terá o abdômen tricotomizado (figura 2) e imediatamente após a indução, no grupo de aplicação de nanopartículas, será aplicada a melhor dose de AgNPcol+gc de forma tópica como foi descrito no edema de pata. O grupo controle não tratado receberá apenas 250 µl de salina estéril (0,9 % via i.p.) e o grupo com indometacina recebe a solução de tratamento (10mg/kg via i.p.) 30 minutos antes da indução do edema. Os animais serão eutanasiados 4 horas mais tarde e a cavidade peritoneal será lavada com 1,5 ml de PBS heparinizado para a colheita peritoneal de células. Os volumes recuperados devem ser semelhantes em todos os grupos experimentais e equivalentes a 95% do volume injetado, a amostra coletada de líquido peritoneal será utilizada para a análise dos níveis de glutathione (GSH), malondialdeído (MDA), concentrações de nitrito (NO₂), concentrações de superóxido dismutase (SOD), contagem total e diferencial de leucócitos, análise da permeabilidade vascular e para a análise de imunoblotting, os animais serão distribuídos em 4 grupos de 5 animais, totalizando 20 animais por experimento, em 7 rodadas de experimento.

Os grupos teste colágeno e goma do cajueiro isolados, só serão utilizados para experimento em peritonite, se o resultado da análise gráfica do edema de pata mostrar resultados positivos e superiores ao esperado com a AgNPcol+gc.

Tabela 3. Grupos utilizados durante a peritonite induzida por carragenina.

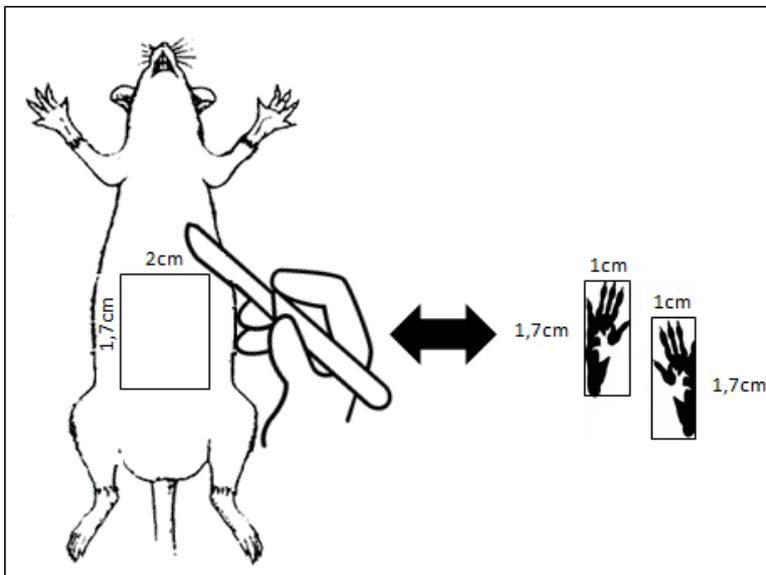
G1: Solução salina estéril a 0,9%

G2: Carragenina 250µl/cavidade

G3: Indometacina 10mg/kg

G4: AgNPcol + gc 75 µl (melhor dose)

Figura 5. Modelo de tricotomização do grupo AgNPcol+gc para tratamento da peritonite, onde é feita a equivalência da área da pata (parte de cima e de baixo) com a área a ser tricotomizada no abdômen, a fim de ter uma proximidade de valores entre a área de tratamento.



Fonte: Autoria própria

4.8 Avaliação da ação da mieloperoxidase (MPO)

Foram retiradas as amostras do tecido da pata dos camundongos e armazenadas a -70°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 e cols. (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 é então colhido. Os níveis teciduais da atividade da MPO foram determinados por meio da técnica de Bradley et al. (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 foram expressos como unidades de MPO (UMPO)/miligrama de tecido.

4.9 Dosagem de glutathione (GSH)

O principal mecanismo de defesa antioxidante do corpo é o tripeptídeo de aminoácidos Glutathione (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 serão 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).

4.10 Dosagem de Nitrito

O método é 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 peritoneal foram centrifugadas a 10.000rpm por 15 minutos, após isso será retirado 100µl do sobrenadante e adicionados à isso 100µl de reagente de Griess para ser analisado no Elisa à 540nm após 10 minutos, os resultados foram expressos em µM de NO₂⁻ por cavidade (SILVA et al., 2017).

4.11 Dosagem de Superóxido Dismutase

A determinação da atividade da Superóxido dismutase foi realizada 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 (SILVA et al., 2017).

4.12 Análise da permeabilidade

A permeabilidade foi analisada através do extravasamento do azul de evans, uma substância com uma alta afinidade por ligação com a albumina sérica. Em protocolo, uma hora antes da indução da peritonite foi administrado o azul de evans pelo plexo orbicular do camundongo, a uma concentração de 20pg/ml, meia hora antes da eutanásia que será feita 4 horas após a indução da peritonite, o lavado peritoneal foi retirado, esse extravasamento será analisado no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 620nm (SILVA et al., 2017).

4.13 Análise estatística

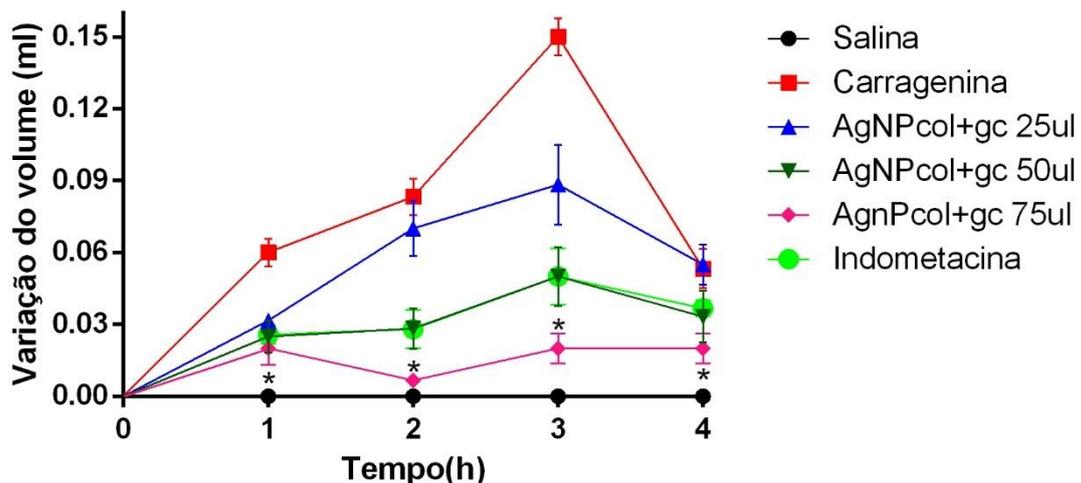
Nas análises de dados estes foram expressos como média \pm S.E.M. Os dados foram analisados estatisticamente por médias através da análise de variância One-way ANOVA com medidas repetidas para comparação entre grupos. O pós-teste de Bonferroni também foi usado. O nível de significância será de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Edema de pata induzido por carragenina

A administração do agente flogístico carragenina aumentou o volume da pata, perdurando por um intervalo de tempo de aproximadamente 4 horas para análise experimental. A formação do edema se deu rapidamente depois da administração, ocasionando um aumento considerável do volume da pata nos grupos carragenina, indometacina, e nos grupos tratados com AgNPcol+gc nas doses de 25 μ l e na dose de 50 μ l. Já na dose de 75 μ l o edema formado não teve diferença estatística com o grupo salina. O pico do edema se dá na terceira hora, desta forma, o grupo carragenina apresentou uma variação de volume de $0,15 \pm 0,00$ ml, sendo que, dos grupos tratados, todas as doses de AgNPcol+gc apresentaram menor volume quando comparado ao grupo carragenina ($p < 0,05$, para todos os grupos tratados com AgNPcol + gc), variando $0,08 \pm 0,01$ ml (25 μ l), $0,05 \pm 0,01$ ml (50 μ l), $0,02 \pm 0,00$ ml (75 μ l) na terceira hora. Representando uma redução de 46%, 66%, 86%, respectivamente, do edema em comparação ao grupo carragenina. Todos os grupos apresentaram redução do edema na quarta hora (figura 6).

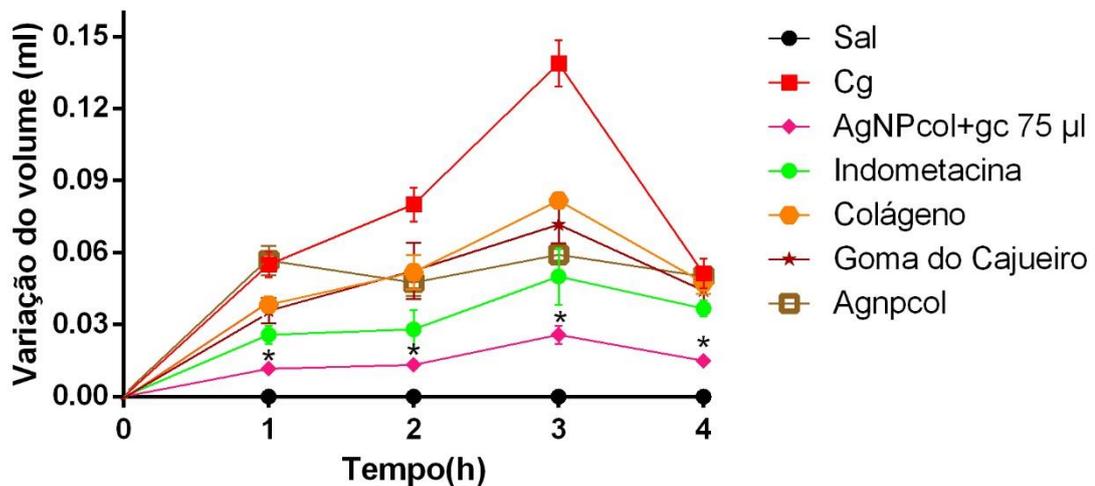
Figura 6. Edema agudo de pata induzido por carragenina – curva dose resposta



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

Na figura 7 com os compostos isolados, foi possível observar a redução do edema em todos os grupos tratados. Sendo o grupo AgNPcol+gc 75 µl o único a não apresentar diferença estatística com o grupo salina, tendo valores ainda mais significativos que o fármaco validado indometacina. Desta forma, as variações de cada grupo na terceira hora foram: $0,15\pm0,009\text{ml}$, $0,02\pm0,001\text{ml}$, $0,05\pm0,01\text{ml}$, $0,08\pm0,002\text{ml}$, $0,07\pm0,007\text{ml}$, $0,05\pm0,002\text{ml}$ (carragenina, AgNPcol+gc 75µl, indometacina, colágeno, goma do cajueiro e AgNPcol, respectivamente).

Figura 7. Edema agudo de pata induzido por carragenina – comparativo dos compostos isolados



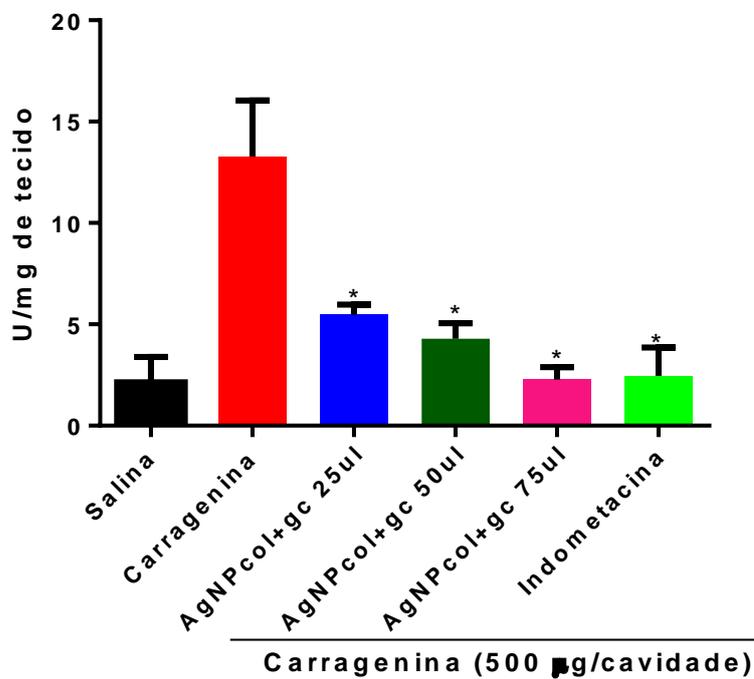
Legenda: O tratamento com AgNPcol + gc foi eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo carragenina e os demais grupos de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo carragenina.

5.2 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A figura 8 mostra que todas as doses utilizadas no estudo 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 $13,27\pm1,38$. Todos os grupos tratados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo carragenina, na dose de 25 µl a concentração foi de $5,4\pm0,2$, na dose de 50 µl foi de $4,2\pm0,3$, na dose de 75 µl foi de $2,2\pm0,3$ e no tratamento padrão com indometacina a concentração foi de $2,4\pm0,6$. Essas concentrações representam uma redução de 59,3%, 68,3%, 83,4% e 81,9%

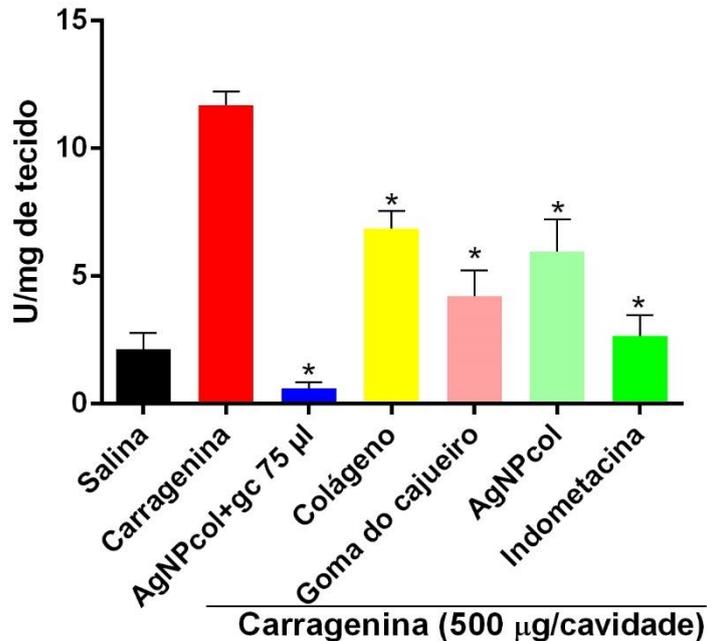
em comparação ao grupo carragenina, respectivamente. Dos grupos tratados, apenas o que recebeu 25 μ l apresentou diferença estatística com o controle salina. Na análise de MPO dos compostos isolados, todos os grupos tratados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo carragenina. Sendo o grupo AgNPcol+gc 75 μ l o de melhor efeito, juntamente com a goma do cajueiro. Estes, portanto, não apresentaram diferença estatística com o grupo salina (figura 9).

Figura 8. Efeito da administração tópica de AgNPcol+gc 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 \pm SEM. * Indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo carragenina, sendo AgNPcol+gc 75 μ l o mais relevante dos grupos tratados.

Figura 9. Efeito da administração intraperitoneal de AgNPcol+gc, Colágeno, Goma do cajueiro e AgNPcol na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina no tecido da pata.



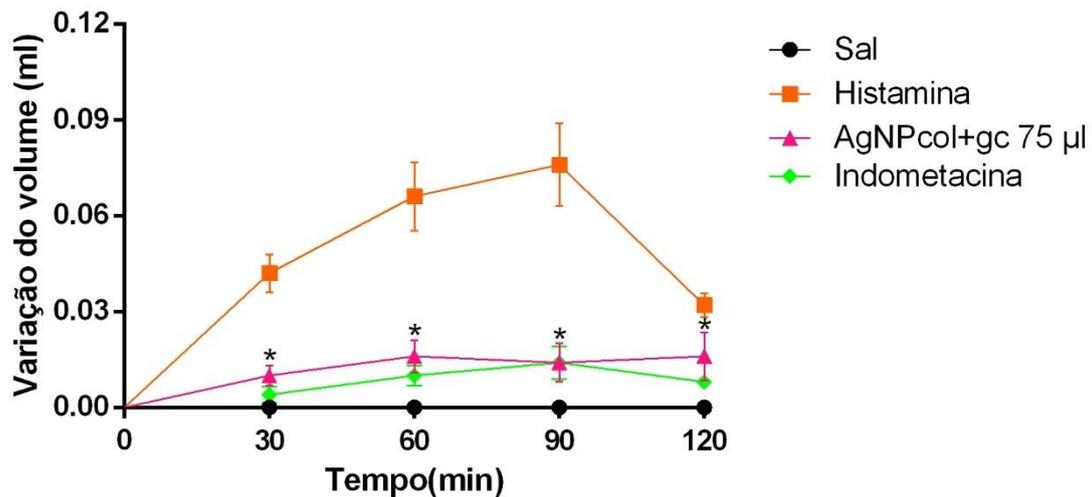
Legenda: Solução salina ou carragenina foi injetada na superfície plantar dos animais. Atividade da MPO foi detectada no tecido da pata após 4h. Os resultados são expressos em média±SEM. * Indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo carragenina, sendo AgNPcol+gc 75µl o mais relevante dos grupos tratados.

5.3 Efeito da AgNPcol+gc sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos

A AgNPcol+gc 75µl inibiu o edema induzido por histamina a 1% (100 µg/pata) a partir dos primeiros 30 minutos, perdurando até os 90 minutos ($p < 0,001$) comparando com o edema no grupo tratado com a droga padrão indometacina até os 90 primeiros minutos (10 mg/kg), tendo como referência o grupo Histamina (figura 10). As variações de volume no pico do edema (90min) foram: $0,07 \pm 0,01$ (Histamina), $0,014 \pm 0,006$ (AgNPcol+gc tópica), $0,014 \pm 0,005$ (Indometacina). Os grupos salina,

indometacina, AgNPcol+gc 75µl não apresentaram diferença significativa entre si, mas sim, com o grupo Histamina.

Figura 10. Edema de pata induzido por histamina com tratamentos AgNPcol+gc T.

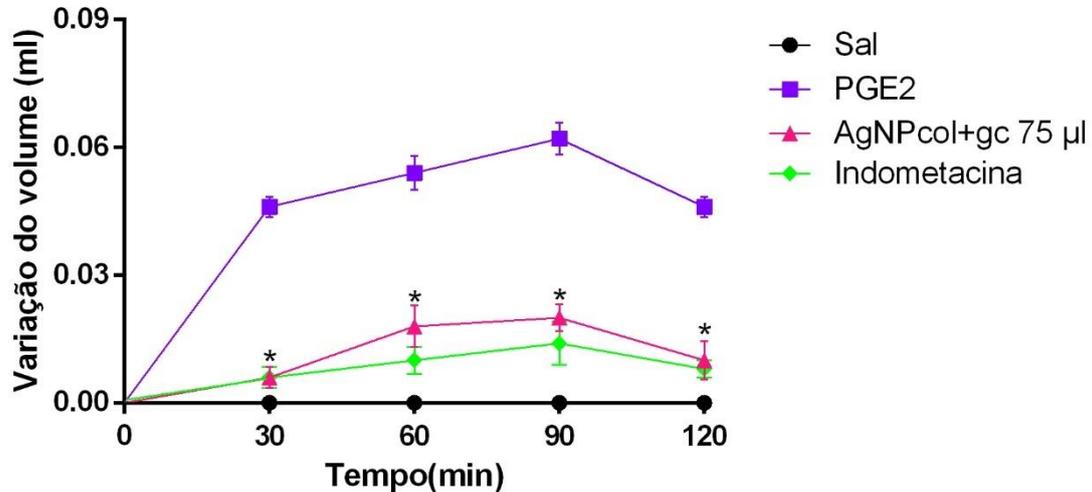


Legenda: O tratamento com AgNPcol+gc 75 µl foi eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo histamina (* $p < 0,05$). Os resultados são expressos em média \pm S.E.M.

5.4 Efeito da AgNPcol+gc sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E2 em camundongos

A AgNPcol+gc 75µl inibiu o edema induzido pela prostaglandina E2 (3.0 nmol/pata) a partir dos primeiros 30 minutos, perdurando até os 90 minutos ($p < 0,001$) comparando com o edema no grupo tratado com a droga padrão indometacina até os 90 primeiros minutos (10 mg/kg), tendo como referência o grupo PGE2 (figura 11). As variações de volume no pico do edema (90min) foram: $0,06 \pm 0,003$ (PGE2), $0,02 \pm 0,003$ (AgNPcol+gc 75µl), $0,014 \pm 0,005$ (indometacina). Os grupos Indometacina, AgNPcol+gc 75µl não apresentaram diferença entre si, mas sim, com o grupo PGE2. O grupo salina apresentou diferença significativa com os grupos PGE2 e AgNPcol+gc 75µl.

Figura 11. Edema de pata induzido por PGE2 com tratamentos AgNPcol+gc 75µl.

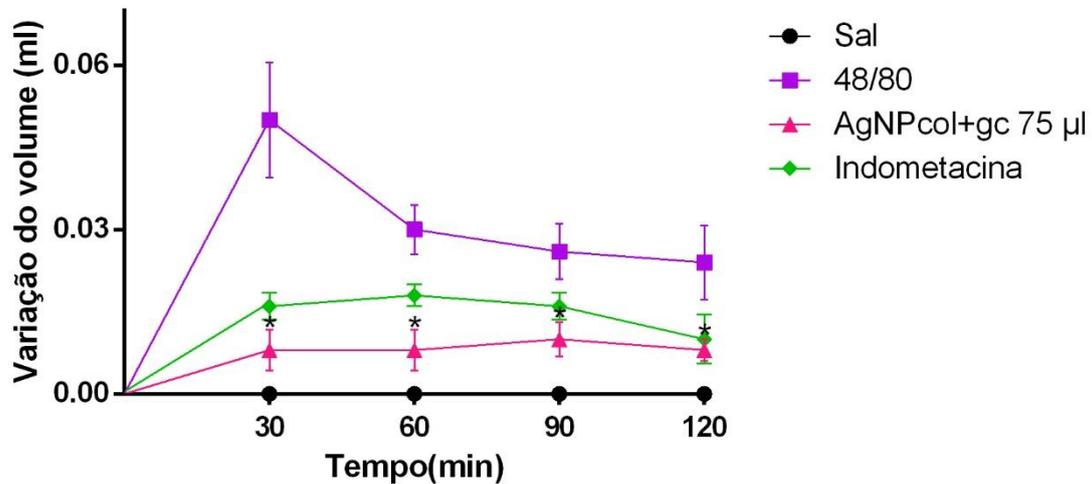


Legenda: O tratamento com AgNPcol+gc 75µl foi eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo PGE2 (* $p < 0,05$). Os resultados são expressos em média \pm S.E.M.

5.5 Efeito da AgNPcol+gc sobre o edema de pata induzido por 48/80 em camundongos

A AgNPcol+gc 75µl inibiu o edema induzido por 48/80 (12 µg/pata) a partir dos primeiros 30 minutos, perdurando até os 90 minutos ($p < 0,001$) comparando com o edema no grupo tratado com a droga padrão indometacina até os 90 primeiros minutos (10 mg/kg), tendo como referência o grupo 48/80 (figura 12). As variações de volume no pico do edema (30min) foram: $0,05 \pm 0,01$ (48/80), $0,01 \pm 0,00$ (AgNPcol+gc 75µl), $0,016 \pm 0,002$ (Indometacina). Os grupos salina, indometacina, AgNPcol+gc 75µl não apresentaram significância entre si, mas sim, com o grupo 48/80.

Figura 12. Edema de pata induzido por 48/80 com tratamento AgNPcol+gc 75 μ l.

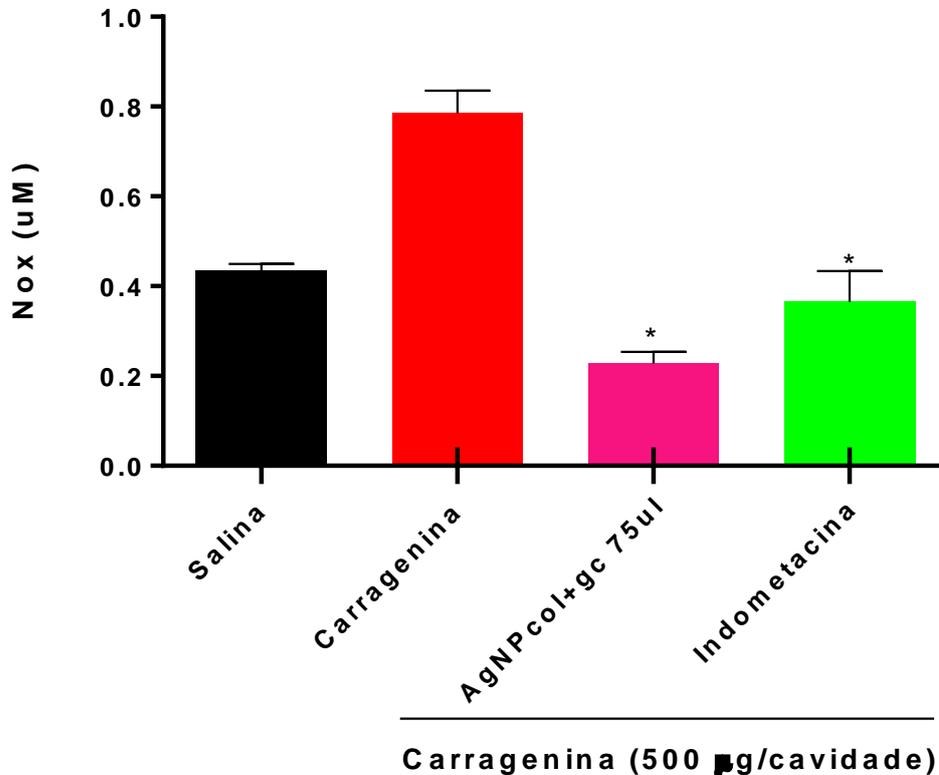


Legenda: O tratamento com AgNPcol+gc 75 μ l foi eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo 48/80 (* $p < 0,05$). Os resultados são expressos em média \pm S.E.M.

5.6 Nitrito

O tratamento com AgNPcol+gc na dose de 75 μ l apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo carragenina. Esse por sua vez, apresentou valores de $0,78 \pm 0,04 \mu\text{M}$ de nitrito, enquanto o grupo com dose de 75 μ l apresentou valores de $0,22 \pm 0,02 \mu\text{M}$, apresentando uma redução de 71% quando comparado ao grupo carragenina, sem, no entanto, ter diferença estatística com o grupo com tratamento padrão de indometacina, que apresentou valores de $0,36 \pm 0,06 \mu\text{M}$, o que significa uma redução de 53% quando comparado ao grupo carragenina.

Figura 13. Avaliação da ação da AgNPcol+gc no estresse oxidativo através da avaliação de nitrito no modelo de peritonite induzida por carragenina.

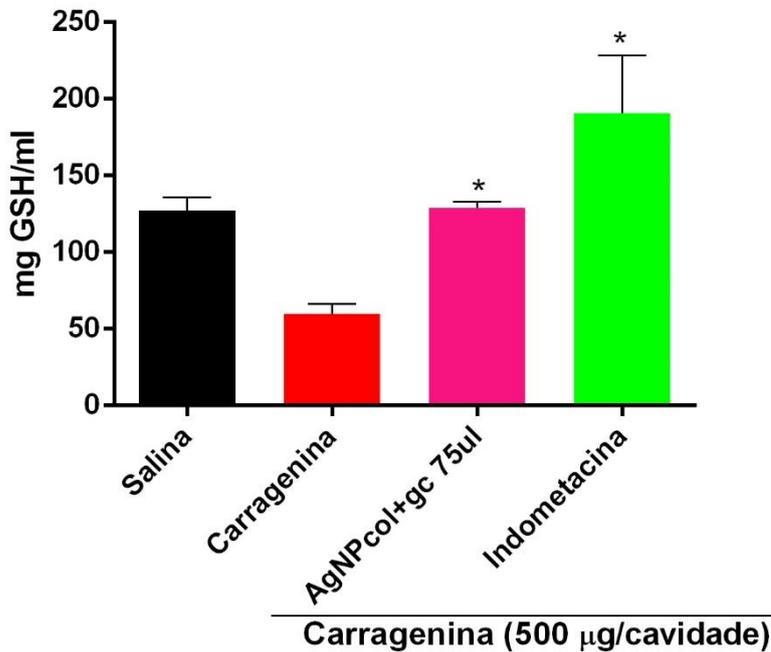


Legenda: A figura mostra que a dose de 75 µl diminui significativamente a quantidade de nitrito quando comparada ao grupo carragenina. Os valores são representados como média±SEM. *p<0,05 quando comparado ao grupo carragenina.

5.7 GSH

Na avaliação da Glutathione (GSH), a aplicação de carragenina diminuiu de forma estatisticamente significativa os níveis de GSH quando comparado ao grupo salina. O tratamento com AgNPcol+gc 75µl obteve diferença estatística quando comparado ao grupo carragenina (52,36±6,7 NPSH/g de GSH), enquanto o grupo com aplicação tópica exibiu valores de 132,8±3,4 NPSH/g, não apresentando diferença estatística com o grupo com tratamento padrão de indometacina, que apresentou valores de 190,4±38,01 NPSH/g, ou com o grupo salina (figura 14). Corroborando com os resultados encontrados na avaliação do nitrito, esses resultados demonstram um potencial antioxidante da AgNPcol+gc.

Figura 14. Efeito da AgNPcol+gc 75 μ l na atividade da Glutathiona (GSH).

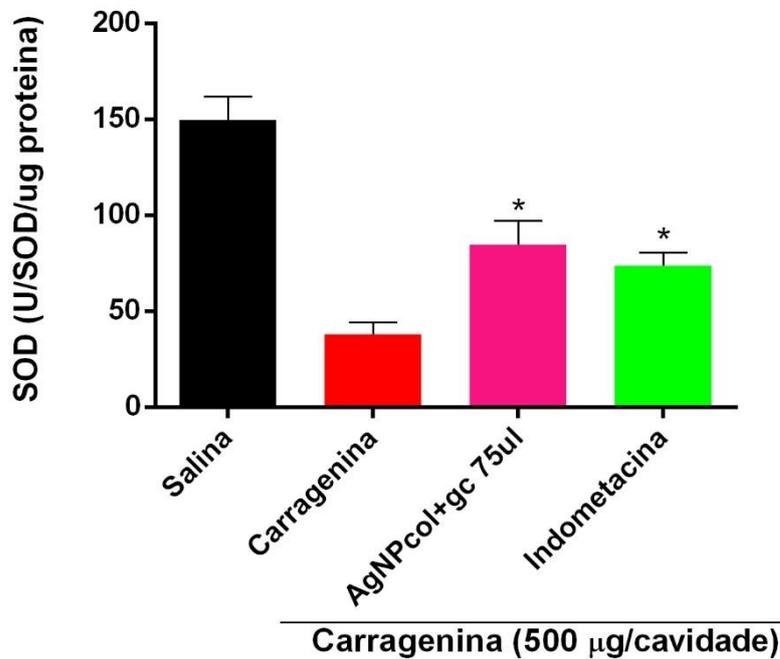


Legenda: A figura mostra que a AgNPcol+gc 75 μ l aumentou significativamente a quantidade de GSH quando comparada ao grupo carragenina. Os valores são representados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo carragenina.

5.8 SOD

Na avaliação da enzima Super Óxido Dismutase (SOD), foi observado que a aplicação de carragenina diminuiu os níveis de SOD quando comparado ao grupo salina, o tratamento com AgNPcol+gc 75 μ l apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo carragenina, Os grupos carragenina e AgNPcol+gc tópica apresentaram valores de $38,11 \pm 5,9$ U/SOD/ μ g e $68,96 \pm 17,51$ U/SOD/ μ g de proteína, o grupos de tratamento com nanopartícula, no entanto, não apresentou diferença estatística quando comparado ao tratamento padrão de indometacina, que apresentou valores de $73,61 \pm 6,9$ U/SOD/ μ g de proteína (figura 15).

Figura 15. Efeito da AgNPcol+gc 75 μ l na atividade da Super Óxido Dismutase (SOD).

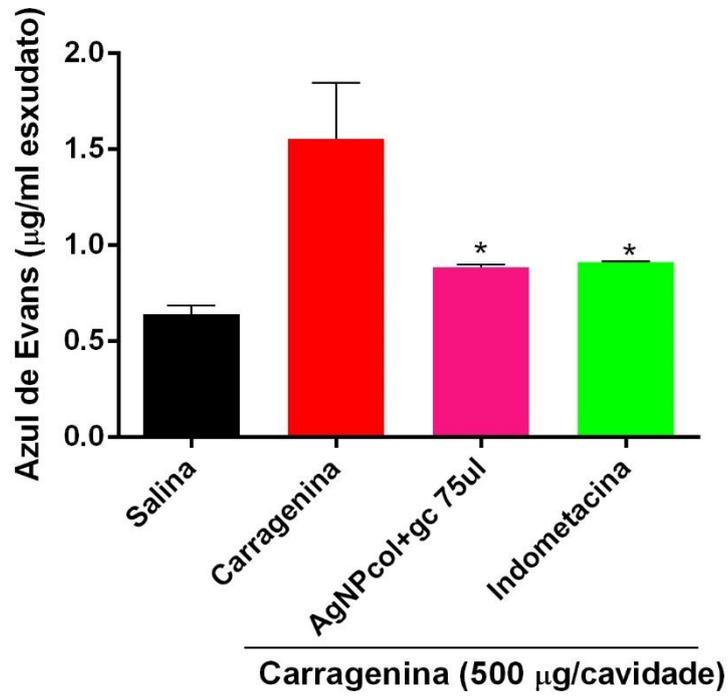


Legenda: A figura mostra que a AgNPcol+gc 75 μ l aumentou significativamente a quantidade de SOD quando comparada ao grupo carragenina. Os valores são representados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo carragenina.

5.9 Permeabilidade vascular

A figura mostra o resultado de uma peritonite com marcação de Azul de Evans, tratada com aplicação tópica de AgNPcol+gc 75 μ l e grupo com uso de droga padrão. A AgNPcol+gc tópica apresentou diferença significativamente estatística quando comparada ao grupo carragenina. Esse, por sua vez, apresentou valores de 1,5 \pm 0,2 mg/ml de exsudato de Azul de Evans, enquanto o grupo de nanopartícula de aplicação tópica exibiu valores de 0,88 \pm 0,01 (figura 16). Os grupos de tratamento não apresentaram diferença estatística entre si e nem com o grupo salina, mas sim, com o grupo carragenina, indicando um menor infiltrado celular e presença de exsudato quando comparado ao grupo apenas com o agente inflamatório.

Figura 16. Efeito da AgNPcol+gc 75 μ l na permeabilidade vascular na peritonite induzida por carragenina.



Legenda: Os resultados da análise do exsudado com Azul de Evans são expressos em média \pm SEM. * Indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina. # Indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo carragenina.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a AgNPcol+gc foi eficaz na redução de edema induzido por carragenina e mediadores inflamatórios, desta forma diminui também a migração celular por diminuir consideravelmente o estímulo inflamatório. Outra atividade descrita foi sua atividade protetora contra o estresse oxidativo e aumento ou preservação da defesa antioxidante.

Um primeiro experimento foi realizado para avaliar a dose ideal de AgNPcol+gc para o modelo experimental de aplicação tópica, partindo do princípio que a literatura apresenta divergências quanto à dose e a forma de aplicação de nanopartículas de prata no modelo in vivo. Desta forma foi realizado uma curva dose resposta de três doses para avaliar qual seria a mais adequada para o modelo experimental de inflamação aguda, utilizando como referência o estudo de Cardoso et al. 2017, que trouxe um comparativo entre a ação de 50 µl de aplicação tópica de AgNPcol com seus compostos isolados.

Foram utilizadas as doses tópicas de 25 µl, 50 µl, 75 µl para tratamento. Destas doses pode-se verificar que a de 75µl foi a de melhor resultado quanto a redução do volume da pata do animal. Trabalhos como o de Cardoso et al (2017), 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 antiinflamatório de nanopartículas de prata em modelos experimentais in vivo de edema de pata induzido por carragenina. Nos seus trabalhos verificaram que as AgNP 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. Nossos dados corroboram esses achados, pois a melhor inibição encontrada foi de 75% na dose de 75 µl da AgNPcol+gc, durante a terceira hora após a indução da inflamação.

Inicialmente, o primeiro modelo testado foi o edema de pata induzido por carragenina, que é um protótipo da fase exsudativa da inflamação aguda (DIVAKAR et al., 2010; SARKAR, 2015). Após uma hora de injeção de carragenina, o aumento da permeabilidade vascular é geralmente mediado pela histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade deve-se à atividade das cininas, como a bradiginina (VILAR et al., 2016). Na terceira hora do edema pode ser visto um pico

reacional, sendo caracterizada pela ação das prostaglandinas na permeabilidade capilar, principalmente a PGE₂, com intensa infiltração de células polimorfonucleares (PMN) (SMITH et al., 1998; PRAJAPATI et al., 2014).

Foi mostrado que a AgNPcol+gc 75 µl inibiu a formação de edema em seu pico às 3 horas. Comparados a ela, tiveram seus compostos isolados, colágeno, goma do cajueiro, e a própria AgNPcol, que assim como no estudo de Cardoso et al. 2017, mostraram efeito antiedematogênico, porém, ainda sim, AgNPcol+gc 75 µl se destaca, por mostrar potentes resultados sem diferença estatística com o grupo controle salina. Assim, ao atuar nessa terceira fase, caracterizada pela liberação intensa de PGE₂, podemos dizer que esse composto está envolvido no controle de prostaglandinas. Como já mencionado, o edema de pata induzido por carragenina envolve uma variedade de mediadores, e a atividade antiinflamatória de AgNPcol+gc 75 µl no edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos foi investigada. O composto 48/80 promove a formação de edema osmótico acelular, principalmente aumentando a permeabilidade vascular e a liberação de aminas vasoativas, como a histamina que é derivada da degranulação de mastócitos (CARDOSO et al., 2017; MALING et al., 1974; CHATTERJEA et al., 2012; WERNERSSON; PEJLER, 2014; SILVA et al., 2015).

Portanto, partindo do princípio que a ação antiinflamatória da AgNPcol+gc pode envolver mediadores como histamina e serotonina, foi avaliada sua ação sobre edema induzido pelo composto 48/80, um polissacarídeo reconhecido pela capacidade de liberar dos mastócitos os mediadores histamina e serotonina (GUPTA et al., 2003).

Os resultados demonstram que o tratamento com AgNPcol+gc 75 µl foi capaz de reduzir o edema da pata após a injeção de composto 48/80. Estes resultados sugerem que ela pode apresentar ação vasoativa ou propriedade antagonista quanto à manifestação inflamatória. Podendo ainda atuar estabilizando a membrana do mastócito, impedindo a liberação do conteúdo presente em seus grânulos.

Afim de esclarecer a ação da AgNPcol+gc sobre histamina e prostaglandinas, fomos mais específicos ao testar este tratamento nos edemas de pata induzidos pela injeção intraplantar da histamina e PGE₂.

Histamina é uma amina vasoativa, que leva a alterações de permeabilidade vascular. De ação imediata, são liberadas em sequência do agente agressor. Fundamental para a contração e separação das células endoteliais, desta forma

permite passagem de leucócitos circulantes como infiltrado inflamatório. Na maioria das vezes, a histamina é armazenada no mastócito e tem importante efeito ativador sobre a fosfolipase A2, enzima responsável pela formação de prostaglandinas. Já a PGE2 induz a produção de diversos quimioatraentes, tais como citocinas pró-inflamatórias e leucócitos (CARVALHO, 2011, HARRIS et al., 2002; KAUR et al., 2004).

A AgNPcol+gc 75 µl reduziu significativamente a inflamação ocasionada pelo agente PGE2 e pela histamina. Complementando a minimização do edema induzido pela carragenina em sua fase final, e por 48/80, podendo-se inferir que essa nanopartícula VT pode atuar estabilizando a membrana do mastócito, impedindo a liberação do conteúdo presente em seus grânulos. O fato do composto reduzir o edema em sua fase aguda, induzido por diferentes agentes inflamatórios, sugere que o mecanismo de ação do composto de tratamento possa estar relacionado com mecanismos influenciados por estes mediadores durante o processo inflamatório (HARRIS et al., 2002; KAUR et al., 2004).

Além da análise da inibição do edema de pata verificou-se o efeito dessa nanopartículas na atividade da enzima MPO. Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilicos 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). No presente estudo a AgNPcol+gc reduziu de forma significativa nas três doses aplicadas sendo a de 75µl, a que apresentou uma redução ainda mais significativa, quando comparada aos outros grupos, não tendo diferença quando comparada ao grupo controle salina. Resultados similares aos encontrados no estudo de Cardoso e colaboradores (2017) onde comprovaram que uma nanopartícula de prata estabilizada com colágeno diminuiu de forma significante a atividade dessa enzima no tecido da pata, nesse estudo eles ainda identificaram que o colágeno em si consegue também diminuir a atividade da MPO quando aplicado de forma tópica, embora de uma maneira menos eficaz ao da nanopartícula. Os resultados mostraram que o tratamento com AgNPcol+gc reduziu significativamente os níveis de MPO, com destaque para a dose de 75 µl, reforçando que o efeito antiinflamatório deste composto envolve, pelo menos em parte, a inibição da infiltração de neutrófilos.

A literatura mostra que a goma do cajueiro possui efeito benéfico ao diminuir a atividade da enzima MPO, Carvalho e colaboradores em 2015 avaliaram o efeito gastroprotetor da goma de cajueiro e ao analisar os níveis de mieloperoxidase, 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+gc 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, 2017).

Com base na discussão acima, estes resultados sugerem que o efeito antiinflamatório da AgNPcol+gc 75 μ l está intimamente relacionado com a inibição da liberação de mediadores inflamatórios ou com a atividade dessas moléculas. Foi, também, investigado o papel da AgNPcol+gc 75 μ l no extravasamento vascular usando o corante azul Evans, no modelo de peritonite induzida por carragenina. Foi demonstrado que o recrutamento celular na cavidade peritoneal 4h após a administração de carragenina, reduziu de forma significativa em camundongos pré-tratados com AgNPcol+gc 75 μ l, diminuindo a contagem de leucócitos, bem como neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal, (MOTIRAM KAKALIJ et al., 2016). O azul de Evans é administrado para que através de sua colocação associada com a migração neutrofílica, seja evidenciado redução ou aumento da inflamação sistêmica. Desta forma, o tratamento com as AgNPcol+gc 75 μ l se mostrou um potente antiinflamatório de efeito sistêmico, na inflamação aguda (Ullah et al., 2018). Estes dados sugerem que o efeito AgNPcol+gc 75 μ l no teste de permeabilidade vascular foi através da inibição de mediadores inflamatórios que interagem com a permeabilidade.

Foi avaliado o potencial antioxidante da AgNPcol+gc ao averiguar seus efeitos sobre os níveis de GSH, SOD e nitrito, na peritonite induzida por carragenina. Os resultados deste estudo estão de acordo com os encontrados na literatura, como no estudo de Ramachandran e Nair em 2011 que foi avaliado o potencial antioxidante

das AgNPs sintetizadas com *T. catapa*, administrado via oral na dose de 250mg/kg. Como resultado eles viram que essa nanopartícula diminuiu a concentração de MDA (27,27% de diminuição), e aumentou SOD e GSH em 32,29% e 34,49%, sugerindo o potencial antioxidante que as nanopartículas tem, concordando com nossos resultados, onde a administração tópica de AgNPcol+gc 75 µl conseguiu manter os níveis de GSH, SOD e diminuir os níveis de nitrito.

O efeito potencial antioxidante da nanopartícula de prata pôde ser evidenciado pela diminuição dos níveis de nitrito e preservação 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 sob 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 (BARBOSA, et al., 2010).

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 (POPRAC, et al., 2017).

A atividade antioxidante durante o processo inflamatório é importante porque os radicais livres dos leucócitos, principalmente dos neutrófilos, causam alguns tipos de dano aos tecidos através da degradação direta de alguns componentes celulares essenciais, ou podem começar ou amplificar a resposta inflamatória através da

modulação da expressão de muitos genes envolvidos no processo inflamatório (VASCONCELOS, et al., 2017).

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- α , IL-1 β e IFN- γ (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 O₂, superóxido, tióis, metais de enzimas e é oxidado para íons inativos de nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) (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 foi avaliada a quantidade de NO indiretamente através da avaliação do nível de nitrito em um modelo de peritonite induzida pela injeção de carragenina, onde os resultados mostram que a administração desse agente foi responsável por elevar os níveis de nitrito, porém, o tratamento com AgNPcol+gc 75 μ l de forma tópica, foi capaz de inibir a elevação desses níveis. Esses dados corroboram com a literatura, onde um estudo mostrou que a AgNP conseguiu reduzir 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- α , IL-1 β e IFN- γ , 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).

Analisando a literatura, as nanopartículas de prata ainda são utilizadas em diversos estudos relacionados com inflamação, tanto in vitro, quando in vivo, evidenciando o potencial antiinflamatório desses compostos e elucidando como eles desempenham suas propriedades antiinflamatórias (TIAN et al, 2007; NADWORNYY, et al., 2008; POIRIER, et al., 2013; YILMA, et al., 2013; BHOL E SCHECHTER, 2005; WONG, et al., 2009; SHEIKPRANBABU, et al., 2009).

Tian e seus colaboradores (2007) analisaram a aplicação tópica de nanopartículas de prata no processo de cicatrização de queimaduras, em modelo de roedores, durante 30 dias. A avaliação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios IL-6, fator β 1 de transformação de crescimento (TGF- β 1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e interferon δ (IFN- δ) confirmaram que as AgNPs podem modular a expressão das citocinas de uma forma dependente de dose, diminuindo assim a inflamação e também a cicatriz.

A atividade antiinflamatória de aplicação tópica também foi testada em um modelo suíno de dermatite de contato. Os autores identificaram que mesmo após 48 horas do tratamento houve uma diminuição de células inflamatórias com o uso do nanopartículas, mesmo quando comparado ao tratamento padrão e houve também uma diminuição significativa de edema e eritema relacionados à alergia, a pele após 72hrs encontrava-se com características próximas ao normal, enquanto os outros grupos com tratamento permaneceram com inflamação. Os autores postularam a hipótese de que esse efeito parece estar relacionado à prata reduzida encontrada nas nanoestruturas, e não aos íons de prata, pois testaram o tratamento também com

nitrato de prata e os resultados entre os dois tratamentos não foram similares. Portanto, o desenvolvimento de nanopartículas com alta concentração de prata reduzida podem gerar tratamentos válidos para diversas doenças inflamatórias (NADWORNÝ, et al., 2008).

Outros autores avaliaram a aplicação tópica de nanopartícula de prata a 1%, 1 vez por dia, durante 4 dias antes da indução de uma dermatite alérgica em roedores. Eles verificaram que o tratamento com nanopartículas diminuiu os níveis de citocinas inflamatórias IL-12 e TNF- α , ao reduzir o RNA mensageiro dessas citocinas quando comparado ao grupo sem tratamento. As AgNP também diminuíram os sinais inflamatórios como edema e eritema ao reduzir a infiltração de células inflamatórias, sem apresentar, no entanto, efeito tóxico sistêmico como perda de peso, causado por esteroides de alta potência e imunossupressores (BHOL E SCHECHTER, 2005).

Yilma e colaboradores (2013) sugere que as AgNP 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 AgNP 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 antiinflamatórias (WONG, et al., 2009; SHEIKPRANBABU, et al., 2009; SINGH E RAMARAO, 2012).

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou evidências sobre o potencial antiinflamatório e antioxidante da AgNPcol+gc na dose de 75 µl por aplicação tópica em modelos de inflamação aguda. Desta forma, o efeito antiinflamatório pôde ser evidenciado através de vários mecanismos envolvendo a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e PGE2, assim como pela redução do edema envolvendo o composto 48/80. Age também prometendo reduzir a permeabilidade vascular, com consequente diminuição dos níveis de neutrófilos no sítio inflamatório.

Age ainda com a preservação da defesa antioxidante, mantendo os níveis de GSH e SOD, com diminuição nos níveis de nitrito, mostrando grande potencial como protetora contra danos causados pela ação deletéria dos radicais livres. AgNPcol+gc pode representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da inflamação e de doenças diversas, representando uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias associadas ao estresse oxidativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. S., OLIVEIRA, E. F., PAULA, H. C. B., & DE PAULA, R. C. M. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v.89, p.1277-1282, 2012.

ALTAVILLA, C.; CILIBERTO, E. **Inorganic Nanoparticles: Synthesis, Applications, and Perspectives – An Overview**, New York: CRC Press, 2011.

ANDERSEN, C. J. Bioactive Egg Components and Inflammation. **Nutrients**, v. 7, p. 7889–7913, 2015.

BALBINO, CA; PEREIRA, LM; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase : Past , present and future . A tribute to John R . Vane (1927 – 2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208–219, 2006.

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

BROWN, L.O.; HUTCHISON, J.E. Formation and Electron Diffraction Studies of Ordered 2-D and 3-D Superlattices of Amine-Stabilized Gold Nanocrystals, **J. Phys. Chem B**. v. 105, p.8911-8916, 2001.

CALIXTO, J. B., OTUKI, M. F. & SANTOS, A. R. Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v.69, p.1-12, 2003.

CARDOSO, V. S. et al. Collagen-based silver nanoparticles for biological applications : synthesis and characterization. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 36, p. 1–9, 2014.

CARDOSO, V. S. et al. Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. **Materials Science & Engineering C**, v. 74, p. 382–388, 2017.

CARPENTER, A. W.; LANNOY, C. F. DE; WIESNER, M. R. HHS Public Access. **Environ Sci Technol**, v. 49, n. 9, p. 5277–5287, 2015.

CARVALHO, A.M.R. Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da Riparina II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL-TIRAMINA) em modelos experimentais. Dissertação de Mestrado, 2011.

CARVALHO, D. 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.

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

CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. **Bioquímica ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

CHAMUSCA, FV; REIS, SRA; LEMAIRE, D; MEDRADO, AP. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. **R. Ci. med. biol.**, Salvador, v.11, n.1, p.70-78, jan./abr. 2012.

CHATTERJEA, D. et al. Mast cell degranulation mediates compound 48/80-induced hyperalgesia in mice. **Bioch bioph res computol**, v. 425, n. 2, p. 237-243, 2012.

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

COMBLAIN, F. et al. Curcuminoids Extract , Hydrolyzed Collagen and Green Tea Extract Synergically Inhibit Inflammatory and Catabolic Mediator ' s Synthesis by Normal Bovine and Osteoarthritic Human Chondrocytes in Monolayer. **Nutraceuticals Inhibit Inflammation and Catabolism**, p. 1–20, 2015.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. **Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório**. Rev. Virtual Química, v.1, n. 3, p.241-256 Jul/Set 2009.

CRUZ-TOPETE, D.; CIDLOWSKI, J. A. One Hormone Two Actions: Anti- and Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 0, p. 20–32, 2015.

CUNHA, P. L. R., DE PAULA, R. C. M., & FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v.3, p.649-660, 2009.

DARGO, H.; AYALIEW, A.; KASSA, H. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, n. August, p. 18–23, 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.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.15, p.316-328, 2005.

DELERIVE, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 32048-32054,

1999.

DENG, J. S. et al. Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the
DIVAKAR, C. Madhu et al. Anti-inflammatory and Antioxidant activities of Polyscias
filicifolia saponins. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 1, p. 41-47, 2010.

DREHER, D.; JUNOD, A F. Role of oxygen free radicals in cancer development.
Eur J Canc v. 32, n. 1, p. 30-38, 1996.

ESCH, R. W. VAN; KOOL, M. M.; AS, S. VAN. NSAIDs can have adverse effects
on bone healing. **Medical Hypotheses**, v. 81, n. 2, p. 343–346, 2013.
ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. **Journal of Ethnopharmacology**,
v. 137, n. 3, p. 1161–1171, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças
relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**,
v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GAILLET, S.; ROUANET, J. Silver nanoparticles : Their potential toxic effects after
oral exposure and underlying mechanisms – A review. **Food and Chemical
Toxicology**, v. 77, p. 58–63, 2015.

GURMAN, P., MIRANDA, O. R., CLAYTON, K., ROSEN, Y., & ELMAN, N. M.
Clinical Applications of biomedical microdevices for controlled drug delivery. **Mayo
Clinic Proceedings**, v.90, p.93-108, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular
fluids. **Arch obiochem bioph**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and
medicine. 1999.

HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, R.P. Prostaglandins
as modulators of immunity. **Therapeutic. Immunology**, 3: 144–150, 2002.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**. v. 82, n. 5 (supl), p. 206-212, 2006.

JR, C. V.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

JR., M. A. M. et al. PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO: UM MÉTODO SIMPLES PARA A INTRODUÇÃO DA NANOCIÊNCIA EM LABORATÓRIO DE ENSINO. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Colágeno: a molécula de múltiplas funções**, USP, São Paulo, 2008.

KAPOOR, S., Preparation, characterization, and surface modification of silver particles. **Langmuir**, v. 14, n. 5, p. 1021-1025, 1998.

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.

KHEYBARI S., SAMADI N., HOSSEINI S.V., FAZELI A., FAZELI M.R. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by chemical reduction method. **DARU Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v.18, p. 168-172, 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES. P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Imm**, v. 13, n. 3, p. 159, 2013.

LALRINZUALI, K.; VABEIRYUREILAI, M.; JAGETIA, G. C. Investigation of the Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of Ethanol Extract of Stem Bark of Sonapatha *Oroxylum indicum* In Vivo. **International Journal of Inflammation**, p.1-8, 2016.

LEE C. H.; SINGLA A.; LEE Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.

LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, p. 26087–26124, 2015.

LIMA, A. C. et al. ESTIMULANTES QUÍMICOS NA EXTRAÇÃO DA GOMA DE CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*, L.) 1. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 409–415, 2001.

LONGUI, C. A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**. v. 83, n. 5 (supl.), p. 163-171, 2007.

LOPES, M. A., ABRAHIM, B. A., CABRAL, L. M., RODRIGUES, C. R., SEIÇA, R. M. F., VEIGA, F. J. B., & RIBEIRO, A. J. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: contribution of M cells. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v.10, p.1139-1151, 2014.

LOWELL, C. A.; MAYADAS, T. N. Overview-studying integrins in vivo. **Methods Mol Biol**, v. 757, p. 1–25, 2012.

MALING, H. M. et al. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J Pharm and Exp Therap**, v. 191, n. 2, p. 300-310, 1974.

MCCORD, J. O. E.; FRIDOVICH, IRWIN. Production of O₂ in photolyzed water demonstrated through the use of superoxide dismutase. **Photoch photob**, v. 17, n. 2, p. 115-121, 1973.

MCEVER, R.P. Selectins: Novel receptor that mediate leucocyte adhesion during inflammation. **Thrombosis and haemostasis**. v.65, p.223-228, 1991.

MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de.; SILVA, N. P. da.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W de M. **Aspectos celulares e**

moleculares da inflamação. Sinopse de Reumatologia, São Paulo, p. 66 - 81, 20 ago. 2008.

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.

MORGAN, M. J.; LIU, Zheng-gang. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 103, 2011.

MOTIRAM KAKALIJ, R. et al. Vanillic acid ameliorates cationic bovine serum albumin induced immune complex glomerulonephritis in BALB/c mice. **Drug develop res**, v. 77, n. 4, p. 171-179, 2016.

NATSUKI, J.; NATSUKI, T.; HASHIMOTO, Y. A Review of Silver Nanoparticles : Synthesis Methods , Properties and Applications. **SciencePG**, v. 4, n. 5, p. 325–332, 2015.

NOGUEIRA, A. F.; GONÇALVES, M. C.; SANTOS, L. S. S.; MELO JR., M. A. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. **Carnes**: no caminho da pesquisa. Cocal do Sul: Imprint; 2001.

OSTUNI, R.; NATOLI, G.; CASSATELLA, M.A.; TAMASSIA, N. Epigenetic regulation of neutrophil development and function. **Seminars in Immunology**. v.28, p.83-93, 2016.

ÖZGÜNER, M.F.; DELÝBAŞ N.; TAHAN V.; KOYU A.; KÖYLÜ H. Effects of industrial noise on the blood levels of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and malondialdehyde. *Eas. J. Med.*, v.4, n.1, p.13-15, 1999.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiol Rev.**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2011.

PAUDEL, K. S. et al. NIH Public Access. **Ther Deliv**, v. 1, n. 1, p. 109–131, 2015.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.742, p.315-325, 2000.

PINTO, A. C.; **Quim. Nova**, v.18, p.608, 1995.

PRAJAPATI, V. D. et al. RETRACTED: Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carb polymers*, v. 105, p. 97-112, 2014.

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, RS. UNOPAR. **Cient Ciênc Biol Saúde**; vol. 15, n. 1, 2013.

QUINN, R. J.; CARROLL, A. R.; PHAM, N. B.; BARON, P.; PALFRAMAN, M. E.; SURaweera, L.; PIERENS, G. K. & MURESAN, S. Developing a Drug-like Natural Product Library. **J. Nat. Prod.** 71, 464–468, 2008.

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

RATYAKSHI; CHAUHAN, R. P. Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles. **Asian Journal of Chemistry**, v.21, p. 113-116, 2009.

RODRIGUES, V. **Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos.**

2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. F.; SILVA, L. C. **Estrutura da carne.**

SARKAR, M. Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Leaf Extract of *Mangifera indica* L.(Anacardiaceae) in Rats. **Int J Drug Develol Res**, v. 7, n. 3, p. 021-025, 2015.

SAYERS, R. D., Aortic aneurysm, inflammatory pathway and nitric. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, 84, 239-246, 2002.

SCHOELLHAMMER, C. M.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. NIH Public Access. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 11, n. 3, p. 393–407, 2014.

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.

SHIRLEY, Rachel; ORD, Emily NJ; WORK, Lorraine M. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. **Antioxidants**, v. 3, n. 3, p. 472-501, 2014.

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, H. F. O. **Nanopartículas e prata conjugadas com hclato de doxiciclina: síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*.** (Tese – Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte. p.22. 2015.

SILVA, J. A. . et al. Administração cutânea de fármacos : desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 2010.

SILVA, M. C. C. E et al. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: APLICAÇÃO DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*) EM NANOTECNOLOGIA TECHNOLOGICAL EXPLORATION: THE APPLICATION OF GUM CASHEW (*Anacardium occidentale*) IN NANOTECHNOLOGY. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 4, p. 55–69, 2013.

SILVA, M. et al. Gastroprotective Properties of Cashew Gum, a Complex Heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale* , in Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats [^]. **DRUG DEVELOPMENT RESEARCH**, v. 76, n. 3, p. 143–151, 2015.

SILVA, R. O. et al. Chemico-Biological Interactions Riparin A , a compound from *Aniba riparia* , attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS**, p. 1–9, 2015.

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, 2017.

SILVA, R. O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem-biolol interac** v. 229, p. 55-63, 2015.

SIM, A.S.; SALONIKAS, C.; NAIDOO, D.; WILCKEN, D.E.L. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.785, p.337-344, 2003.

SINGH, S.K.; PRASAD, A.K.; OLSEN, C.E.; JHA, A.; JAIN, S.C.; PARMAN, V.S.; WENGEL. **Journal Phytochemistry**, Vol. 43, p.1355, 1993.

SMITH, C. J. et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proc Nat Acad Scienc**, v. 95, n. 22, p. 13313-13318, 1998.

SOSTRES, C. et al. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs , aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, 2010.

SUBBIAH, R.; VEERAPANDIAN, M.; YUN, K. S. Nanoparticles : Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 36, p. 4559–4577, 2010.

THOMAS, C.J.; SCHRODER, K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. **Trends Immunol.** v.34, p. 317-328, 2013.

VALKO M, D. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

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.

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.

VILAR, M.S. A. et al. Assessment of phenolic compounds and anti-inflammatory activity of ethyl acetate phase of *Anacardium occidentale* L. bark. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1087, 2016.

VONKEMAN, H. E.; LAAR, M. A. F. J. VAN DE. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs : Adverse Effects and. **COMPLICATIONS OF THERAPY**, v. 39, n. 4, p. 294–312, 2010.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nat Rev Immuno**, v. 14, n. 7, p. 478, 2014.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1020-1037, 2012.

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

XIE, T. et al. Review of natural product databases. **Cell Prolif.**, v. 48, p. 398–404, 2015.

ANEXO 1



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Atividade antiinflamatória de nanopartículas extraídas de produtos naturais**", registrada nº **295/17**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. MARCELO DE CARVALHO FILGUEIRAS** do Departamento Ciências Biomédicas_ Campus **Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **08/09/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Dezembro/ 2017 à Julho/2019
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ swiss
Nº de Animais	288
Peso/ Idade	20-35g/ 30 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 08 de Setembro de 2017.


Profª Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora