



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PEDRO MARTINS DA SILVA FILHO**

**NANOPLATAFORMA DE SÍLICA MESOPOROSA LIBERADORA DE ÓXIDO  
NÍTRICO E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

**FORTALEZA**

**2022**

PEDRO MARTINS DA SILVA FILHO

NANOPLATAFORMA DE SÍLICA MESOPOROSA LIBERADORA DE ÓXIDO NÍTRICO  
E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisane Longhinotti  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique  
Silva de Sousa

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S582n Silva Filho, Pedro Martins da.  
Nanoplatформа de Sílica Mesoporosa Liberadora de Óxido Nítrico e suas Potenciais Aplicações  
Terapêuticas / Pedro Martins da Silva Filho. – 2022.  
134 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em  
Química, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Elisane Longhinotti.  
Coorientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.
1. Nanopartículas. Sílica. Óxido nítrico. Aplicação terapêutica. I. Título.

CDD 540

---

PEDRO MARTINS DA SILVA FILHO

NANOPLATAFORMA DE SÍLICA MESOPOROSA LIBERADORA DE ÓXIDO NÍTRICO  
E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Aprovado em 11/03/2022

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Elisane Longhinotti (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva Sousa (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pierre Basilio Almeida Fachine  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Profa. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos  
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

## AGRADECIMENTOS

À Instituições Funcap e CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

A professora Dra. Elisane Longhinotti e Ao professor. Dr. Eduardo pela orientação.

Aos professores Nilberto Nascimento, Edson Holanda e Mayron Vasconcelos por todo o suporte que foi capaz de engrandecer e direcionar essa tese de doutorado e, a Alexandre Andrade e Iury Paz pela valiosa ajuda nas análises.

A todos os professores, que me ensinaram, repassaram informações, conteúdos, exemplos e me deram experiência, é graças a eles que cresci dentro desse universo de conhecimento e saberes, não só na universidade, mas na vida. Agradeço em especial aos professores, Jackson Rodrigues, Ronaldo Ferreira, Selma Mazzetto, Audisio Filho, Nágila Ricardo, Luiz Gonzaga. Não posso esquecer da professora Renata Oliveira, a quem infelizmente perdi contato. Aos amigos, aos quais fiz no período da graduação e durante o mestrado, eu agradeço por todo tempo que tivemos, todos os momentos de descontração, de seriedade e de confiança pelo quais passamos. A minha amiga Marisa Lima, Anny Grazielly, Ricardo Douglas, Jefferson. Aos amigos fora da universidade, Alison Jarbas, Paulo Ferreira, Raquel Matias. Ao David Maia um grande amigo e a Rogers Bezerra, tão especial. A todos aqueles de alguma forma ajudaram a semear, cultivar e colher os frutos dessa vida de pós-graduando.

“When dreams will never last, caught in fears  
of past  
Shades of forgotten melodies will sing your  
tears far away  
Harmony will stay If you believe in modesty  
and peace.”

Lesiem-Temperantia

## RESUMO

O desenvolvimento de nanoplataformas contendo moléculas liberadoras de óxido nítrico (NO) surgiu como uma estratégia para reduzir os efeitos tóxicos, aumentando a segurança e a eficiência terapêutica dessa molécula. Além disso, para aplicações terapêuticas é importante o controle da dosagem, o que requer encontrar um método eficiente de liberação. Nanoplataformas à base de sílica mesoporosa (MPSi) têm se mostrado um hospedeiro interessante para muitas moléculas e biomoléculas. Esses materiais são facilmente funcionalizados, o que geralmente melhora sua biocompatibilidade, oferecendo uma plataforma versátil para incorporação de doadores de NO, tais como nitroprussiato de sódio (SNP). O nitroprussiato de sódio é um potente doador de NO, porém, de uso limitado devido a liberação conjunta de uma molécula de cianeto. Estudos anteriores mostraram que MPSi apresentam alta adsorção de nitroprussiato de sódio, sendo esta plataforma denominada de MPSi-NP. Neste trabalho a nanoplataforma, MPSi-NP, foi utilizada em diferentes ensaios *in vivo*. Testes de citotoxicidade mostraram uma significativa redução na liberação de cianeto (64%) e ensaios biológicos, com células de mamíferos (Vero), mostraram apenas uma queda na viabilidade celular (13%) para a concentração de 1000  $\mu\text{M}$ , enquanto o SNP exibiu um  $\text{LC}_{50}$  de 228  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As MPSi-NP apresentam atividade semelhante para vasodilatação e ativação via sGC-PKG-VASP quando comparadas ao SNP livre. Ensaio de diálises, em luz ambiente e temperatura de 37°C, mostraram que as MPSi-NP liberam 63% de NO em contraste com apenas 18% do SNP durante as primeiras 24 horas, indicando que a sílica atua como facilitadora da liberação de NO. Para atividade antibacteriana, somente o SNP apresentou atividade antibiofilme moderada enquanto as MPSi-NP foram capazes de reduzir as células viáveis do biofilme para bactérias resistentes, em 641 e 1445 vezes para a *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, respectivamente. As MPSi-NP reduziram o CIM da ampicilina pela metade para *S. aureus* ATCC 700698 e em quatro vezes para *S. epidermidis* ATCC 35984.

**Palavras-chave:** nanopartículas; sílica; óxido nítrico; aplicação terapêutica.

## ABSTRACT

The development of nanoplatfoms containing NO-releasing molecules emerged as a strategy to reduce toxic effects, improving safety and therapeutic efficiency of the molecule. Furthermore, for therapeutic applications, dosage control is extremely important, which requires an efficient releasing method. Mesoporous silica (MPSi) based nanoplatfoms have shown themselves to be an interesting host for many molecules and biomolecules. These materials are easily functionalized, which improves their biocompatibility, offering a versatile platform to the incorporation of NO donors such as sodium nitroprusside (SNP). Sodium nitroprusside is a potent nitric oxide (NO) releaser, although of limited use due to its cyanide emission. Previous studies have shown that MPSi present high adsorption of sodium nitroprusside, about  $323,9 \pm 7,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ , and this platform was named MPSi-NP. In the current work the MPSi-NP were used in different therapeutical treatments. Cytotoxicity tests showed an excellent reduction in cyanide release (64%) and biological tests, with mammalian cells, showed only a slight drop in cell viability (13%) for the 1000  $\mu\text{M}$  concentration, while SNP showed a  $\text{CL}_{50}$  of 228  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . MPSi-NP presented similar efficacy to vasodilation and activation via sGC-PKG-VASP when compared to free SNP. Dialysis assays using ambient light and 37°C temperature showed that MPSi-NP released 63% of NO in contrast with only 18% of SNP during the first 24 hours, which indicates that silica acts as NO release facilitator. For antibacterial activity, the SNP presented moderated antibiofilm activity and the MPSi-NP were capable of reducing the viable cells of biofilm to resistant bacteria in 641 times for *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 and 1445 times for *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. MPSi-NP was able to reduce ampicillin's CIM by half for *S. aureus* ATCC 00698 and four times for *S. epidermidis* ATCC 35984.

**Keywords:** nanoparticles; silica, nitric oxide; therapeutic application.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Representação da estrutura da sílica .....	25
Gráfico 2-	Reações de hidrólise e condensação e formação do polímero SiO <sub>2</sub> em meio básico.....	26
Gráfico 3-	Formação de mesoporosa através dos surfactantes.....	27
Gráfico 4-	Agentes sililantes comumente utilizados na funcionalização das nanopartículas de sílica.....	27
Gráfico 5-	Possíveis processos de funcionalização da sílica.....	28
Gráfico 6-	Gráfico mostrando o número de publicações envolvendo as palavras-chave: “sílica” e “drug delivery”, realizado na ISI web of Science em 25.04.22.....	29
Gráfico 7-	Funcionalização de materiais de sílica.....	30
Gráfico 8-	Efeito na administração convencional e por liberação controlada.....	30
Gráfico 9-	A produção endógena do NO a partir da conversão do aminoácido L-Arginina.....	31
Gráfico 10-	Representação da atuação da molécula de NO no organismo.....	33
Gráfico 11-	Principais fontes de entrega e transporte de óxido nítrico em sílica.....	33
Gráfico 12-	Síntese de liberadores de óxido nítrico via diazeniodiolatos em materiais de sílica.....	34
Gráfico 13-	Funcionalização de sílica através de compostos mercaptocoxissilano.....	35
Gráfico 14-	Exemplo de utilização de compostos orgânicos para liberação de NO.....	35
Gráfico 15-	Exemplo de possíveis fixações de complexo liberadores de NO.....	36
Gráfico 16-	Exemplos de ação Antineoplásico de sílica liberadoras de NO. a) Curva de crescimento do tumor de acordo de nanopartículas mesoporosas ocas (HMON), com entrega de glicose oxidase (GOx) e L-Arginina. b) Crescimento de células de ovário neoplasiaosas (A2780 e e HeyA8) e células de ovário transformado [T29 H-Ras (G12V) e T80 H-Ras (G12V)] na presença de sílica liberadora de NO (MAP com diazeniodiolatos).....	37

Gráfico 17-	Esquema de ação do ROS produzidos a partir de NO.....	37
Gráfico 18-	Taxa de cicatrização para sílica liberadoras de NO feridas sem e com infecção bacteriana causada por Staphylococcus Aureus Resistente à Meticilina (MRSA).....	39
Gráfico 19-	Mecanismo mais aceito para liberação de NO e cianeto do nitroprussiato. Decomposição do nitroprussiato em NO. O nitroprussiato (I) é reduzido diretamente a (II) pelas hemoproteínas, etc., ou indiretamente via (II) pelos tióis. O caminho que leva à liberação de NO é (I) → (III) → (IV) → NO....	41
Gráfico 20-	Toxicidade relaciona ao cianeto no organismo.....	42
Gráfico 21-	Algumas aplicações de nanoplataformas contendo nitroprussiato: a) (MPSi-NP) para hipertensão e doenças cardiovasculares [94], b) nanotransportadores de azul da Prússia mesoporoso, dopado com nitroprussiato de sódio e docetaxel (DTX @ m-PB-NO) para tratamento Antineoplásico [95], c) nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com nitroprussiato de sódio (SNP @ MSNs) para glaucoma [96,97] e d) Nitroprussiato (MPSi-NP) contendo nanopartículas de sílica (MPSi-NP) para ação antibacteriana[98].....	45
Gráfico 22-	Curva de calibração para o nitroprussiato em solução de NaOH 3 mol L <sup>-1</sup> .....	49
Gráfico 23-	Curva de calibração para nitrito em solução PBS pH 7.2.....	50
Gráfico 24-	Caracterizações de nanopartículas. MEV (a), adsorção-dessorção de N <sub>2</sub> para MPSi (b), espectro de FTIR para MPSi e MPSi-NP (c) e Mössbauer para MPSi-NP (d).....	53
Gráfico 25-	Fotoliberação de NO usando LED azul. (a) Espectro de IV de MPSi-NP em pelotas de KBr irradiadas com led azul, (b) espectro de Mössbauer de NPSi-NP após irradiação (96 h) em dispersão aquosa.....	55
Gráfico 26-	Espectro de UV-Vis do sobrenadante após 96 h de fotoliberação das MPSi-NP dispersas em PBS 7,2 usando um led azul.....	55
Gráfico 27-	Esquema do banho de órgão e a medição da relaxação.....	59
Gráfico 28-	Princípio da análise VASP.....	60

Gráfico 29-	Metodologia utilizada para avaliar a viabilidade celular contra diferentes concentrações de MPSi-NP e NP livre.....	62
Gráfico 30-	Efeito da vasodilatação em aorta de ratos Wistar e comparação de MPSi-NP (círculo azul) e nitroprussiato de sódio livre (SNP, quadrado laranja) nos anéis aórticos pré-contratados com fenilefrina. * p <0,05 vs SNP na mesma concentração.....	63
Gráfico 31-	Efeito vasorelaxante do MPSi-NP na fenilefrina aorta pré-contráída ou artérias pulmonares retiradas de porquinhos-da-índia. Não foram encontradas diferenças estatísticas.....	63
Gráfico 32-	Efeito de 1 µM SNP ou MPSi-NP em comparação com adição isovolumétrica de veículo (controle) apenas ao nível de fosforilação do resíduo serina 239 da fosfoproteína estimulada por vasodilatador de proteínas (VASP), um substrato de cGMP ativado por cGMP proteína quinase (PKG). * p <0,05 vs controle, teste t de Student.....	64
Gráfico 33-	Efeitos de SNP ou MPSi-NP (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 µM) na viabilidade das células VERO. As células foram cultivadas em 24 poços placas até 80% de confluência foi alcançada. Os compostos eram incubados por 18 h, e os experimentos foram repetidos três vezes.....	65
Gráfico 34-	Representação da atuação do óxido nítrico na produção de biofilmes.....	67
Gráfico 35-	Estágios da formação patogênica de biofilme de bactérias planctônicas: [1] fixação inicial, [2] adesão irreversível, [3] formação de microcolônias, [4] Maturação e diferenciação e [5] Dispersão.....	68
Gráfico 36-	Diluição seriada para as medidas de biomassa.....	73
Gráfico 37-	Distribuição da placa para o teste de ação combina entre as MPSi-NP e os antibióticos ampicilina e tetraciclina.....	75
Gráfico 38-	a. Cinética de liberação de NO por 1 g de MPSi-NP ou SNP, foto da coloração da cubeta indicativa da concentração de cianeto para a	

	dispersão de b) SNP, c) MPSi-NP e d) faixa indicativa de concentração para o kit.....	77
Gráfico 39-	Resultados semiquantitativos para a liberação de cianeto, fita indicando concentrações menores que 0.1 mg L <sup>-1</sup> após 24 horas de dialise para a. MPSi-NP e b. SNP; coloração das cubetas para as c. MPSi-NP e c. SNP ou d. MPSi-NP para 0 h, 3 h, 9 h e 24 h de e dialise e vista superior para as cubetas com indicativos da concentração de cianeto para e. MPSi-NP e f. SNP.....	78
Gráfico 40-	Efeito do nitroprussiato (SNP), e nanopartículas de sílica mesoporosa com nitroprussiato (MPSi-NP) na suscetibilidade de biofilmes para bactérias sensíveis: a. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e b. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 e as bactérias resistentes: c. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698 e d. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	79
Gráfico 41-	Efeito do MPSi-NP na susceptibilidade de formação de biofilmes por <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> . Quantificação da biomassa de biofilmes em formação. O eixo x no valor zero representa bactérias não tratadas usadas como controle. As barras de erro representam a média ± SEM, com p <0,0001 (****), 0,0002 (***), 0,0021 (**), 0,0332 (*), 0,1234 (ns), comparando a média de cada coluna com a média de uma coluna de controle.....	80
Gráfico 42-	Resultado da revelação por resazurina para ação associada da ampicilina das MPSi-NP frente a <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	82
Gráfico 43-	Porcentagem de hemólise das MPSi-NP para concentrações na faixa de 5 mg mL <sup>-1</sup> e 0.078 mg mL <sup>-1</sup> .....	83
Gráfico 44-	Viabilidade celular para fibroblastos de camundongo (ATCC® CCL-1) tratados com MPSi-NP por 24 h. Todas as medições foram feitas em triplicado. *** p <0,05 quando comparado ao controle.....	84
Gráfico 45-	Representação do caminho para a ação analgésica do óxido nítrico	85
Gráfico 46-	Atuação do NO em tratamento de feridas.....	87
Gráfico 47-	Espectro de FTIR para o algodão antes e após a impregnação das MPSi-NP.....	93

Gráfico 48-	MEV e EDX das fibras de algodão após a adsorção das MPSi-NP.....	94
Gráfico 49-	TGA, DTA e DSC para algodão, MPSi-NP e algodão-MPSi-NP.....	94
Gráfico 50-	(a) o comparativo em imagem do algodão-MPSi-NP durante 1440 h protegido e exposto a luz ambiente e (b) FTIR das MPSi-NP em pastilha de KBr durante o tempo na faixa 2300-1800 $\text{cm}^{-1}$ .....	95
Gráfico 51-	Cinética de liberação de NO da MPSi-NP em pastilha de KBr durante 700 h.....	96
Gráfico 52-	Cinética de liberação de NO para o algodão-MPSi-NP. input: imagem e espectro do algodão-MPSi-NP em solução de NaOH 3 mol L <sup>-1</sup> .....	96
Gráfico 53-	Resultado do kit eXact® Cyanide- Complete Visual Kit para 250 mg de algodão em 10 mL de água. (a) comparativo entre a cor da fita indicativa (b) análise semiquantitativa em solução.....	97
Gráfico 54-	Custos envolvido na produção de 1 g de algodão-MPSi-NP.....	98
Gráfico 55-	Esquema da adesão e aplicação do Algodão-MPSi-NP e suas possíveis aplicações.....	99
Gráfico 56-	a. Cinética de dialise de NO por 1 g de gel-MPSi-NP e gel-SNP durante 96 h e O gráfico do tempo 0,5 x NO liberado para o gel-MPSi-NP.....	100
Gráfico 57-	Zona de inibição para o gel-MPSi-NP (0,5%, TEA 2,0 % e MPSi-NP 0,5%) contra a. contra S. aureus ATCC 700698 e b. S. epidermidis ATCC 35984.....	101

## LISTA DE TABELA

Tabela 1-	Resultados reportados [41] com base em log e reduções percentuais na viabilidade das células em biofilmes na dose mais alta de nanopartículas de sílica de NO testadas (8 mg/mL) versus brancos (0 mg/mL nanopartículas) .....	38
Tabela 2-	Alguns destaques no desenvolvimento de liberadores de NO a partir da descoberta do nitroprussiato.....	43
Tabela 3-	Lista de reagentes e solventes utilizados.....	48
Tabela 4-	Comparação de diferentes sistemas de liberação de NO na literatura.....	56
Tabela 5-	Bactérias padrão para estudos de suscetibilidade.....	71
Tabela 6-	Óxido nítrico e cianeto liberado por grama de SNP e MPSi-NP após 24 h.....	78
Tabela 7-	Diferença de UFC para SNP e MPSi-NP para <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, <i>S. aureus</i> ATCC 700698 e <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984 para maiores concentrações de nitroprussiato.....	80
Tabela 8-	Menores concentrações dos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) nas quais foram observados CIM e as respectivas concentrações de MPSi-NP contra <i>S. aureus</i> ATCC 700698 e contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	82
Tabela 9-	Algumas patentes que tratam do uso de NO em tratamento de neuropatia.....	86
Tabela 10-	Massa obtidas para as gotos das diferentes formulações.....	92
Tabela 11-	Tentativa de atribuição das bandas observadas durante o processo de síntese e modificação do algodão com MPSi-NP.....	92
Tabela 12-	Relação dos preços dos reagentes.....	97
Tabela 13-	Peso médio de itens contendo algodão, preço real e o prováveis para modificação com MPSi-NP e quantidade de NP para cada produto (valores baseados pelo Gráfico 57).....	98
Tabela 14-	Total de óxido nítrico e cianeto liberado por 1 g de gel após as 24 h e razão de NO/CN <sup>-</sup> .....	100

Tabela 15-	Valores comparativos de toxicidade de compostos contendo cianeto.....	100
Tabela 16-	Diâmetro de zona de inibição do gel-SNP (0,5%, TEA 2,0 % e SNP 0,05%) e (0,5%, TEA 2,0 % e MPSi-NP 0,5) contra <i>S. aureus</i> ATCC 700698 e <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Algodão-MPSi-NP	Fibras de algodão contendo MPSi-NP
AMP	Ampicilina
APTES	(3-aminopropil)triétoxissilano
ATCC	American type culture collection
BET	Brunauer–emmett–teller
BJH	Barret–joyner–halenda
CBM	Concentração bactericida mínima
c-di-GMP	Guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB	CTAB- Brometo de N-Cetil-N,N,N-trimetilamônio
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
Gel-MPSi-NP	Gel contendo mpsi-NP
Gel-SNP	Gel contendo nitroprussiato
GTP	Guanosina trifosfato
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	Concentração inibitória mínima
MPSi	Nanopartículas de sílica mesoporosa
MPSi-NP	Nanopartículas de sílica mesoporosa contendo nitroprussiato
NONOate	Diazeniodiolatos
NOS	Óxido nítrico sintase
OMPI	Organização Mundial da Propriedade Intelectual
PCT	Tratado de Cooperação em Matéria e Patente
PKG	Pproteína quinase G
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEOS	Tetraétoxissilano
TETRA	Tetraciclina
TSA	Meio soja tríptica ágar
TSB	Soja tríptica caldo
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

VASP

Ativação da Proteína Estimulada por Vasodilatador

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 1. NANOPLATAFORMA DE SÍLICA E CARREADORES DE ÓXIDO NÍTRICO</b> .....	25
<b>2.1</b>	<b>Funcionalização de materiais a base de sílica</b> .....	25
<b>2.2</b>	<b>Nanopartículas de sílica carreadoras de fármacos</b> .....	28
<b>2.3</b>	<b>A importância do Óxido Nítrico</b> .....	31
<b>2.4</b>	<b>Nanoplataformas de sílica liberadoras de óxido nítrico</b> .....	33
<b>2.4.1</b>	<i>Principais plataformas de sílica liberadoras de NO e tratamentos terapêuticos</i> .....	33
2.4.1.1	<i>Plataforma de sílica contendo diazeniodiolatos (NONOate)</i> .....	33
2.4.1.2	<i>S-nitrosotiois</i> .....	34
2.4.1.3	<i>Compostos inorgânicos e orgânicos</i> .....	35
<b>2.4.2</b>	<i>Principais aplicações terapêuticas de plataformas de sílica liberadora de NO</i> .....	36
2.4.2.1	<i>Antineoplásico</i> .....	36
2.4.2.2	<i>Ação antimicrobiana</i> .....	38
2.4.2.3	<i>Tratamentos de feridas</i> .....	38
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO NITROPRUSSIATO COMO LIBERADOR DE NO</b> .....	40
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	40
3.1.1	<i>Nitroprussiato</i> .....	40
3.1.2	<i>Aplicações de nanoplataformas contendo nitroprussiato</i> .....	46
<b>3.2</b>	<b>Objetivos</b> .....	47
3.2.1	<i>Objetivo Geral</i> .....	47
3.2.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	47
<b>3.3</b>	<b>Metodologia</b> .....	48
3.3.1	<i>Reagentes</i> .....	48
3.3.2	<i>Nanopartículas de sílica mesoporosa com nitroprussiato</i> .....	48
3.3.2.1	<i>Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa (MPSi)</i> .....	48
3.3.2.2	<i>Preparação das nanopartículas contendo nitroprussiato (MPSi-NP)</i> .....	48
3.3.3	<i>Quantificação de cianeto (CN<sup>-</sup>) liberado das MPSi-NP</i> .....	49

3.3.4	<i>Quantificação de óxido nítrico (NO)</i> .....	49
3.3.5	<i>Estudo de liberação de NO</i> .....	50
3.3.5.1	<i>Em patilhas de KBr</i> .....	50
3.3.5.2	<i>Em solução aquosa</i> .....	50
3.3.6	<i>Caracterização</i> .....	51
3.3.6.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	51
3.3.6.2	<i>Isoterma de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub></i> .....	51
3.3.6.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i> .....	51
3.3.6.4	<i>Espectroscopia Mössbauer</i> .....	51
3.3.6.5	<i>Espectroscopia de absorção na região do UV-vis</i> .....	52
3.4	<b>Resultados e Discussão</b> .....	52
3.4.1	<i>Caracterização das MPSi-NP</i> .....	52
3.4.2	<i>Quantificação de Nitroprussiato, de NO e cianeto</i> .....	54
3.5	<b>Conclusão do Capítulo 2</b> .....	56
4	<b>CAPITULO 3. ATIVIDADE VASODILATADORA E CITOTOXICIDADE DAS MPSi-NP</b> .....	57
4.1	<b>Introdução</b> .....	57
4.2	<b>Objetivos</b> .....	58
4.2.1	<i>Objetivo Geral</i> .....	58
4.2.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	58
4.3	<b>Metodologia</b> .....	59
4.3.1	<i>Estudo das propriedades vasodilatadoras</i> .....	59
4.3.1.1	<i>Estudos Funcionais Vasculares</i> .....	59
4.3.1.2	<i>Ativação da proteína estimulada por vasodilatador (VASP)</i> .....	60
4.3.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	61
4.4	<b>Resultados e Discussão</b> .....	62
4.4.1	<i>Função vascular</i> .....	62
4.4.2	<i>Ativação da Proteína Estimulada por Vasodilatador (VASP)</i> .....	63
4.4.3	<i>Citotoxicidade</i> .....	64
4.5	<b>Conclusão do Capítulo 3</b> .....	65
5	<b>CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DAS MPSi-NP</b> .....	66
5.1.	<b>Introdução</b> .....	66

<b>5.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>70</b>
<b>5.2.1</b>	<b><i>Objetivo Geral.....</i></b>	<b>70</b>
<b>5.2.2</b>	<b><i>Objetivo Especifico.....</i></b>	<b>70</b>
<b>5.3</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>71</b>
<b>5.3.1</b>	<b><i>Cinética de dialise de NO e monitoramento de cianeto liberado.....</i></b>	<b>71</b>
<b>5.3.2</b>	<b><i>Teste da ação bactericida das MPSi-NP.....</i></b>	<b>71</b>
<b>5.3.2.1</b>	<b><i>Microrganismo.....</i></b>	<b>71</b>
<b>5.3.2.2</b>	<b><i>Condições da cultura.....</i></b>	<b>72</b>
<b>5.3.2.3</b>	<b><i>Incubação em placas de 96 poços.....</i></b>	<b>72</b>
<b>5.3.2.4</b>	<b><i>Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM).....</i></b>	<b>73</b>
<b>5.3.2.5</b>	<b><i>Contagem de células viáveis dos biofilmes .....</i></b>	<b>73</b>
<b>5.3.2.6</b>	<b><i>Quantificação da biomassa total.....</i></b>	<b>74</b>
<b>5.3.2.7</b>	<b><i>Avaliação do efeito das MPSi-NP associada aos antibióticos padrão.....</i></b>	<b>74</b>
<b>5.3.3</b>	<b><i>Ensaio de atividade hemolítica para as MPSi-NP.....</i></b>	<b>75</b>
<b>5.3.4</b>	<b><i>Linhas de células e condições de cultura.....</i></b>	<b>75</b>
<b>5.3.5</b>	<b><i>Viabilidade celular.....</i></b>	<b>76</b>
<b>5.4</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>76</b>
<b>5.4.1</b>	<b><i>Cinética de liberação de NO e quantificação do cianeto das MPSi-NP.....</i></b>	<b>76</b>
<b>5.4.2</b>	<b><i>Testes antibacteriano.....</i></b>	<b>78</b>
<b>5.4.3</b>	<b><i>Quantificação de biomassa.....</i></b>	<b>80</b>
<b>5.4.4</b>	<b><i>Avaliação do efeito das MPSi-NP associados aos antibióticos padrões.....</i></b>	<b>81</b>
<b>5.4.5</b>	<b><i>Ensaio de atividade hemolítica para as MPSi-NP.....</i></b>	<b>83</b>
<b>5.4.6</b>	<b><i>Citotoxicidade.....</i></b>	<b>83</b>
<b>5.5</b>	<b>Conclusão do Capítulo 4.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 5. PRODUÇÃO DE FORMULAÇÕES LIBERADORAS DE NO A BASE DAS MPSI-NP.....</b>	<b>85</b>
<b>6.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>85</b>
<b>6.1.1</b>	<b><i>Fibra de algodão contendo as MPSi-NP.....</i></b>	<b>86</b>
<b>6.1.2</b>	<b><i>Gel contendo doadores de NO.....</i></b>	<b>86</b>
<b>6.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>88</b>

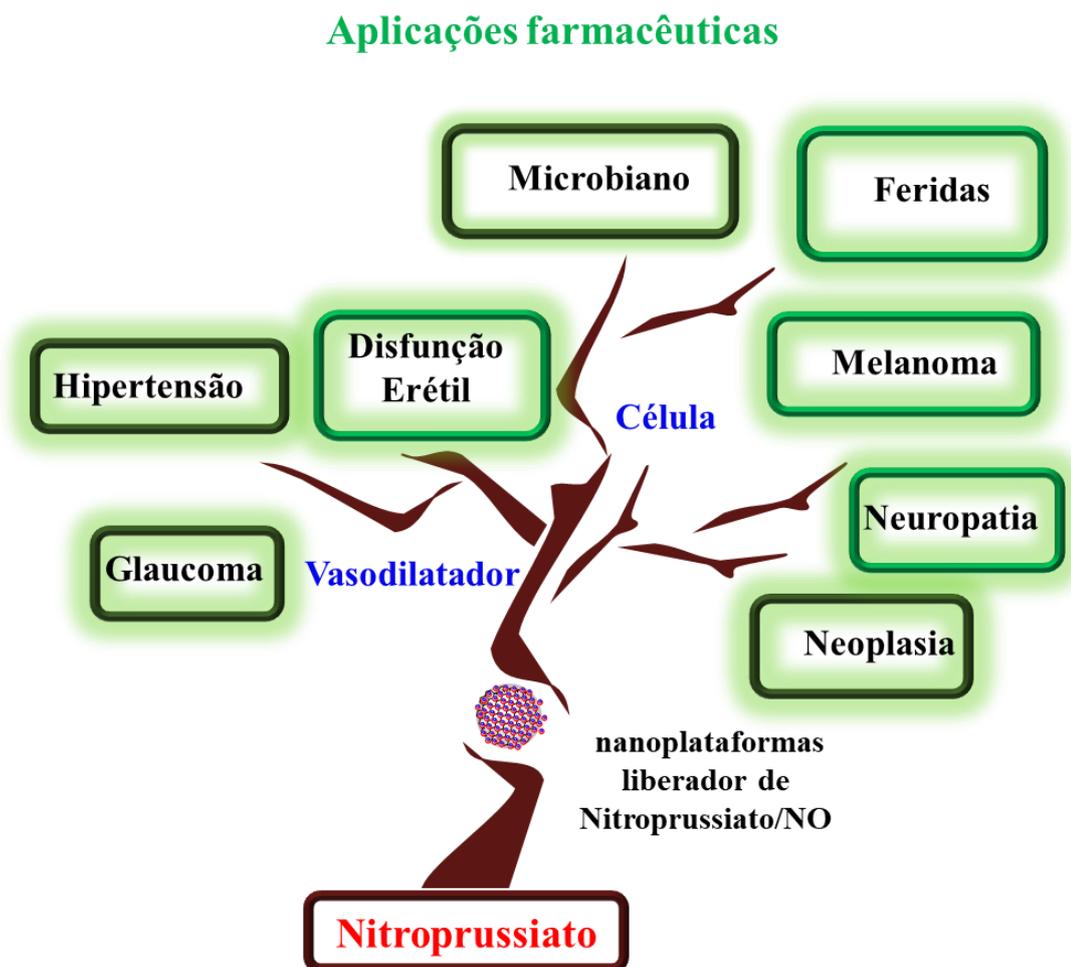
<b>6.2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	88
<b>6.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	88
<b>6.3</b>	<b>Metodologia</b> .....	89
<b>6.3.1</b>	<b>Adesão das MPSi-NP em algodão</b> .....	89
6.3.1.1	Adesão das MPSi-NP sobre algodão (algodão-MPSi-NP).....	89
6.3.1.2	Quantificação de NO.....	89
6.3.1.3	Ensaio de liberação MPSi-NP em KBr.....	89
6.3.1.4	Cinética de liberação de NO em estado sólido.....	89
6.3.1.5	Monitoramento cianeto.....	90
6.3.1.6	Caracterização do algodão-MPSi-NP.....	90
6.3.1.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	90
6.3.1.6.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....;	90
6.3.1.6.3	Análise Termogravimétrica.....;	90
<b>6.3.2</b>	<b>Gel liberador de NO</b> .....	91
6.3.2.1	Produção de Gel-MPSi-NP.....	91
6.3.2.2	Cinética de liberação de NO e quantificação do cianeto final via dialise do Gel-SNP e Gel-MPSi-NP.....	91
6.3.2.3	Atividade antibacteriana do Gel-MPSi-NP.....	91
<b>6.4</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	92
<b>6.4.1</b>	<b>Algodão-NP</b> .....	92
6.4.1.1	Adesão da MPSi-NP em algodão.....	92
6.4.1.2	Cinética de liberação de NO.....	94
<b>6.4.2</b>	<b>Gel liberador de NO</b> .....	99
6.4.2.1	Cinética de dialise de NO liberado e CN <sup>-</sup> total para Gel-MPSi-NP e Gel- NP.....	99
6.4.2.2	Atividade antibacteriana dos géis.....	101
<b>6.5</b>	<b>Conclusão Do Capítulo 5</b> .....	102
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	102
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	104
	<b>APÊNDICE A – COPYRIGHTS</b> .....	126

## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho parte da importância do óxido nítrico e a versatilidade do uso de plataformas carreadores de NO à base de sílica. O nitroprussiato é um potente liberador de NO, no entanto seu uso é limitado devido a toxicidade do cianeto em sua estrutura. Assim, este trabalho de tese envolveu a síntese, estudos e aplicações terapêuticas de nanopartículas de sílica mesoporosa (MPSi) contendo o nitroprussiato de sódio (SNP) como liberador de óxido nítrico, uma nanoplataforma denominada MPSi-NP. Apresentaremos em 4 capítulos os estudos envolvendo liberação de NO e  $\text{CN}^-$ , da nanoplataforma, sua ação como vasodilatador, agente antimicrobiano e algumas formulações para entrega de NO. A seguir, é apresentado de forma esquemática os tópicos que serão abordados em cada capítulo.

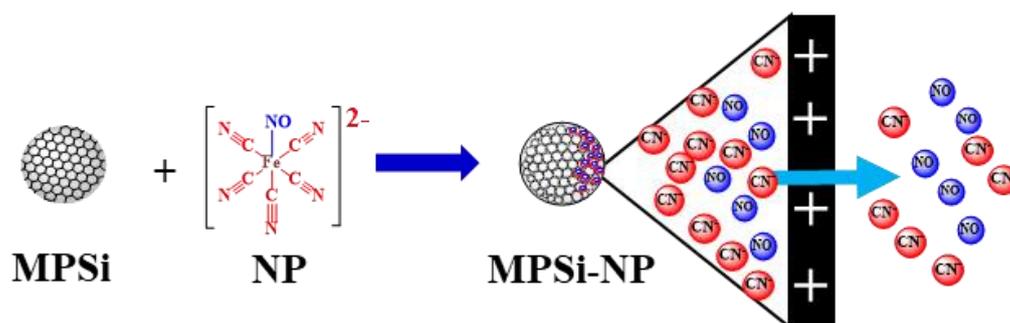
### Capítulo 1. NANOPLATAFORMA DE SÍLICA E CARREADORES DE OXIDO NÍTRICO.

Apresentação sobre os principais materiais de sílica e suas atuações terapêuticas.



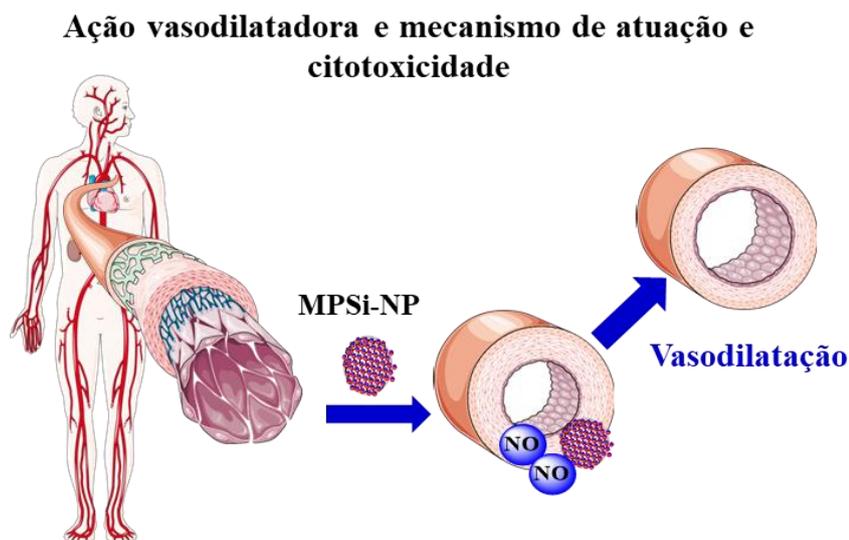
**Capítulo 2.** NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO NITROPRUSSIATO COMO LIBERADOR DE NO. Este capítulo se dedica aos estudos de síntese da nanoplateforma MPSi-NP, quantificação do nitroprussiato no material e avaliação da atividade liberadora de óxido nítrico e cianeto.

**Síntese, quantificação de nitroprussiato, avaliar a liberação de óxido nítrico e cianeto**



**Liberação de NO e retenção de cianeto**

**Capítulo 3.** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA E CITOTOXICIDADE DAS MPSI-NP. Neste capítulo são apresentados estudos sobre ação vasodilatadora das MPSi-NP em aorta e artéria de cobaias e estudo do mecanismo de atuação, bem como estudos de citotoxicidade em células de mamíferos. Com os resultados obtidos desse estudo foi publicado um artigo na revista *Molecular Pharmaceutics* (fator de impacto de 4.939).



## Incorporation of Nitroprusside on Silica Nanoparticles—A Strategy for Safer Use of This NO Donor in Therapy

Pedro M. Silva Filho,<sup>†</sup> Iury A. Paz,<sup>§</sup> Nilberto R. F. Nascimento,<sup>‡</sup> Cláudia F. Santos,<sup>‡</sup> Valdevane R. Araújo,<sup>‡</sup> Camila P. Aquino,<sup>‡</sup> T. S. Ribeiro,<sup>||</sup> Igor F. Vasconcelos,<sup>||</sup> Luiz G. F. Lopes,<sup>§</sup> Eduardo H. S. Sousa,<sup>\*,§</sup> and Elisane Longhinotti<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>‡</sup>Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, 60714-110 Fortaleza, Ceará, Brazil

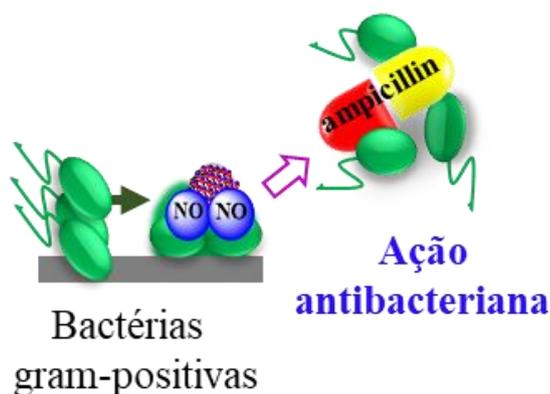
<sup>§</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Cx. Postal 6021, 60440-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>||</sup>Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Ceará, 60440-554 Fortaleza, Ceará, Brazil

Supporting Information

**Capítulo 4.** AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DAS MPSi-NP. Neste capítulo, o estudo da ação das MPSi-NP na inibição de formação de biofilme bacteriano em cepas de bactérias gram-positivas de *Staphylococcus* sensíveis e resistentes e a avaliação do uso combinado das MPSi-NP com antibióticos padrões. Os resultados obtidos deram suporte para uma publicação na revista *International Journal of Pharmaceutics* (fator de impacto de 5.875)

## Inibição da formação do biofilme e ação combinada com antibióticos



*International Journal of Pharmaceutics* 610 (2021) 121220



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

*International Journal of Pharmaceutics*

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)



### The biofilm inhibition activity of a NO donor nanosilica with enhanced antibiotics action

Pedro Martins da Silva Filho<sup>a,b</sup>, Alexandre Lopes Andrade<sup>c</sup>, Jessica Barros Arrais Cruz Lopes<sup>c</sup>, Aryane de Azevedo Pinheiro<sup>c</sup>, Mayron Alves de Vasconcelos<sup>c,d,e</sup>, Said Gonçalves da Cruz Fonseca<sup>f</sup>, Luiz Gonzaga de França Lopes<sup>b</sup>, Eduardo Henrique Silva Sousa<sup>b,\*</sup>, Edson Holanda Teixeira<sup>c,\*</sup>, Elisane Longhinotti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, PO Box 12200, Campus do Pici s/n, Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Integrado de Biomoléculas, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, CEP, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, RN 59610-090, Brazil

<sup>e</sup> Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade de Divinópolis, Divinópolis, MG 35501-170, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Farmacotécnica, Rua Pastor Samuel Munguba, 1210 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE 60430-372, Brazil

**Capítulo 5-** PRODUÇÃO DE FORMULAÇÕES LIBERADORAS A PARTIR DAS MPSi-NP. Neste capítulo, será mostrado o estudo de formulações para o uso das MPSi-NP. Resultados obtidos da produção de fibras de algodão contendo MPSi-NP e gel hidrofílica a base de carbopol serão apresentados, bem como a avaliação da capacidade de entrega de NO de ambos os materiais.

### Formulações para o uso das MPSi-NP



**Gel hidrofílica**



**Fibras de algodão-MPSi-NP**

**Tratamento de :**  
**Ferida crônica**  
**melanoma**  
**Neuropatia**  
**Edema**



## Sílica mesoporosa

### 2 CAPÍTULO 1. NANOPLATAFORMA DE SÍLICA E CARREADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

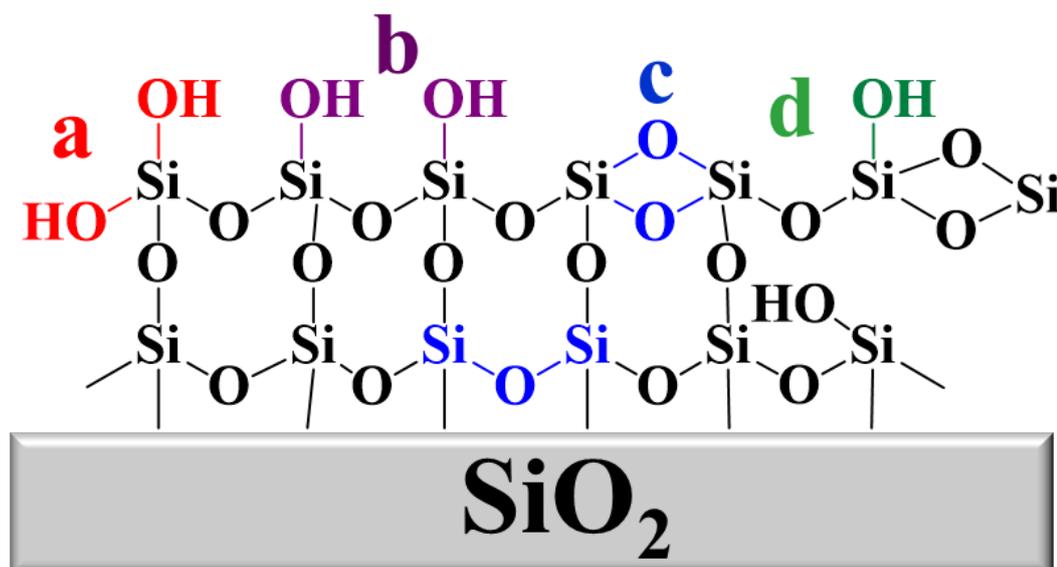
#### 2.1 Funcionalização de materiais a base de sílica

O termo sílica está associado a compostos com unidades estruturais de Si e O, de fórmula geral  $\text{SiO}_2$  (Gráfico 1), constituídas em seu interior por grupos siloxanos (Si-O-Si) e na superfície por hidroxilas ligadas a átomo de silício, denominado de grupos silanóis (Si-OH) [1,2]. Os grupos silanóis estão distribuídos aleatoriamente sobre a superfície e de acordo com sua posição recebem denominações diferentes, as quais são:

- **Geminais:** duas hidroxilas ligadas ao mesmo átomo de silício (Gráfico 1a)
- **Vicinais:** hidroxilas ligadas a átomos de silício sequenciais (Gráfico 1b);
- **Isolados:** hidroxila sem grupos silanóis sequencial (Gráfico 1d)

Encontra-se também na superfície da sílica grupos **siloxanos** (Gráfico 1c) idênticos aos do interior da estrutura [1]. A presença de grupos OH na superfície do material possibilitam modificações químicas alterando suas propriedades[2].

Gráfico 1. Representação da estrutura da sílica.

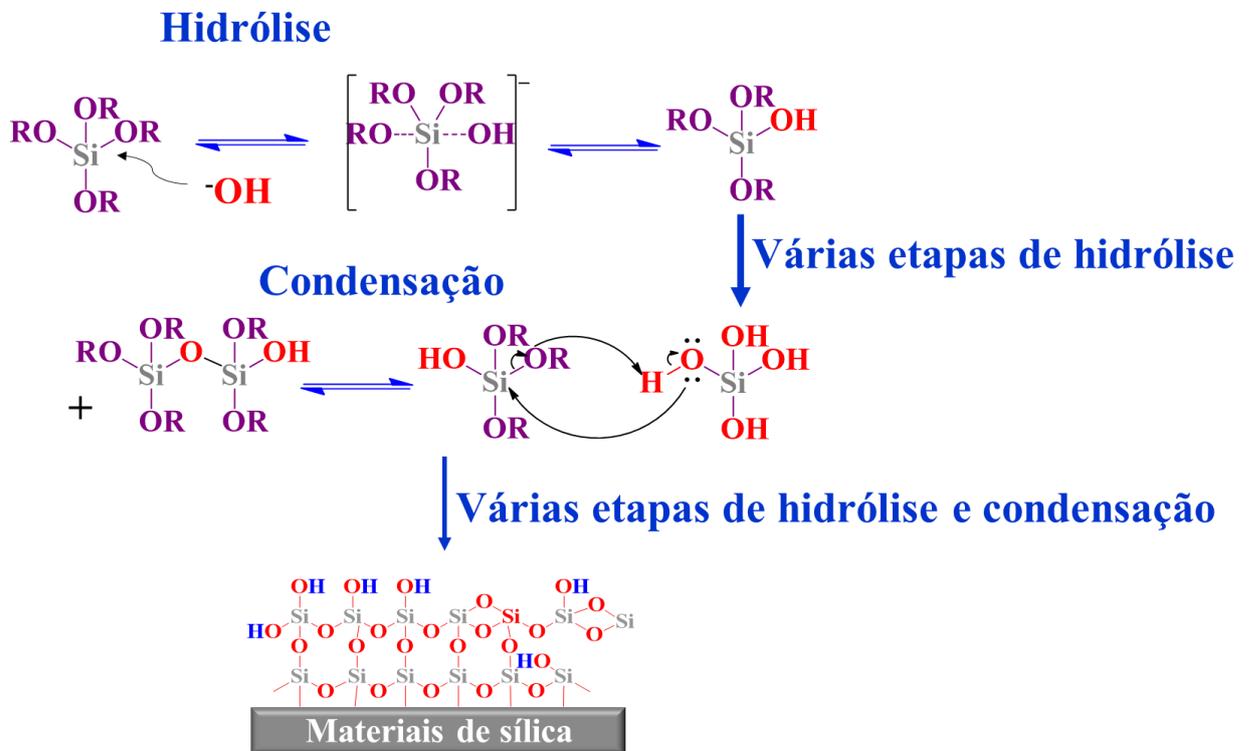


Fonte: O autor

O polímero  $-\text{SiO}_2-$  pode ser obtido através de processos de hidrólise e condensação de precursores de sílica (Gráfico 2) dos quais podem ser inorgânicos, como o sódio silicato ( $\text{Na}_2\text{SiO}_4$ ) ou os organossilicatos, tendo maior destaque o tetraetilortosilicato (TEOS) de fórmula  $\text{Si}(\text{OEt})_4$ [3]. A reação pode ocorrer em meio básico ou ácido. O grupo alcóxido (OR) é muito sensível à hidrólise e apresenta alta reatividade frente a grupos OH possibilitando um efetivo

processo de hidrólise e condensação garantindo a formação completa da rede polimérica de sílica.

**Gráfico 2.** Reações de hidrólise e condensação e formação do polímero SiO<sub>2</sub> em meio básico.

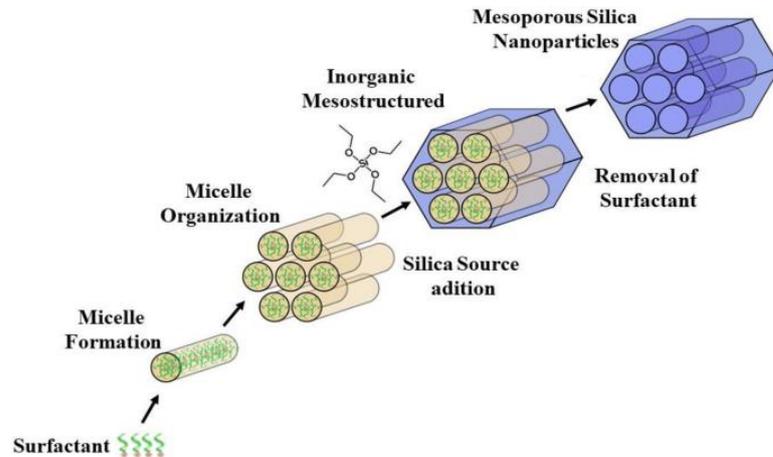


Fonte: O autor

Para obter materiais mesoporosos (diâmetro de poros entre 2 nm-50 nm), utiliza-se agentes direcionadores de poros no processo de síntese, geralmente são utilizados surfactantes que formam micelas sobre as quais ocorrem a polimerização da sílica. o CTAB é o principal “template” direcionador de poros utilizado para a síntese de materiais mesoporosos.[1-3] (Gráfico 3), sendo que, posteriormente se faz necessário sua remoção da estrutura da sílica, seja por calcinação ou extração em meio etanoico.[2,4]

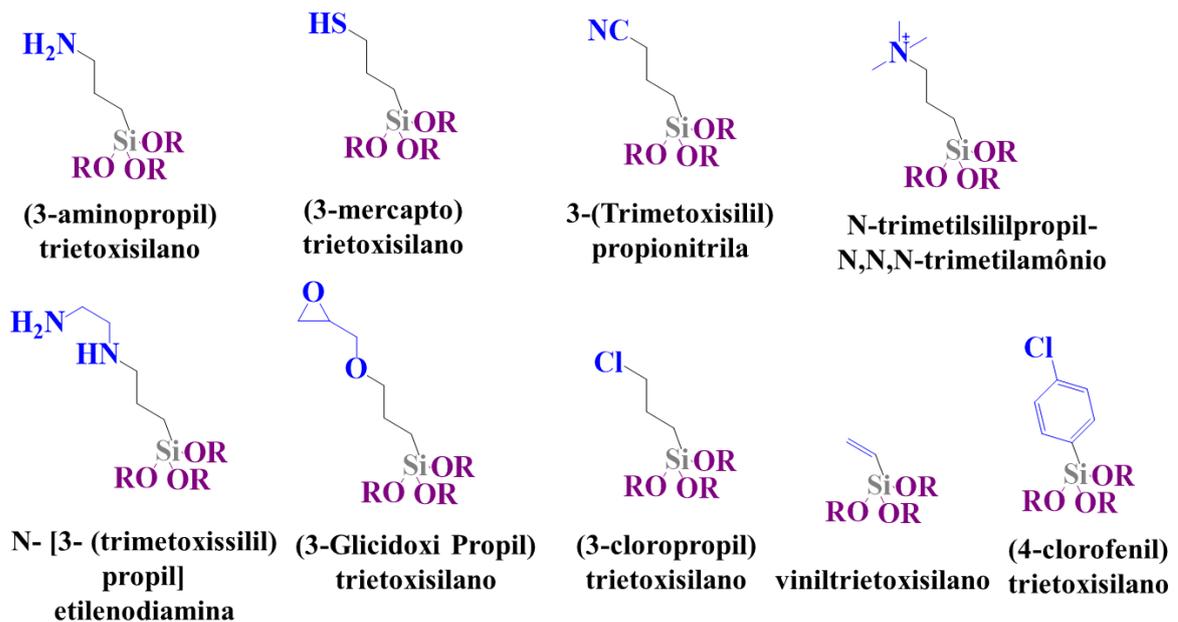
Na superfície da sílica e nas paredes dos poros pode-se incorporar grupos orgânicos ou heteroátomos, inferindo novas características à superfície, originando um material híbrido com propriedades da sílica e dos compostos a ela ancorados, conferindo ao material novas propriedades químicas. Também é possível obter compostos silanos organofuncionalizados, por sililação, a qual consiste na fixação de um composto triorganosilil, principalmente espécies como trimetilalcoxissilil em superfícies. Os silanos organofuncionalizantes mais utilizados são do tipo bifuncional: Y<sub>3</sub>Si-R-X (Gráfico 4).

**Gráfico 3.** Formação de mesoporosa através dos surfactantes.



Fonte: Adaptado de Carvalho et al (2000)

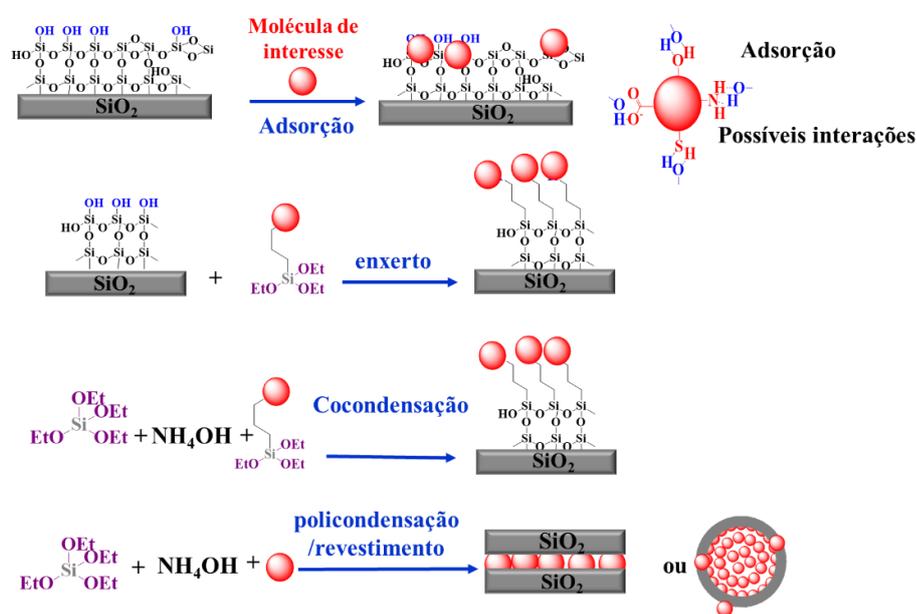
**Gráfico 4.** Agentes sililantes comumente utilizados na funcionalização das nanopartículas de sílica.



Fonte: O autor

O híbrido (sílica-agente imobilizado) é obtido através de dois procedimentos básicos, o “grafiting”, também chamado de enxerto e o direto ou co-condensação. No primeiro, a funcionalização ocorre em uma etapa pós a síntese e no segundo os agentes funcionalizantes são adicionados durante a formação da estrutura do material [3]. A imobilização pode ocorrer por meio de ligação covalente, adsorção, policondensação e/ou revestimento do material (Gráfico 5).

**Gráfico 5.** Possíveis processos de funcionalização da sílica.



Fonte: O autor

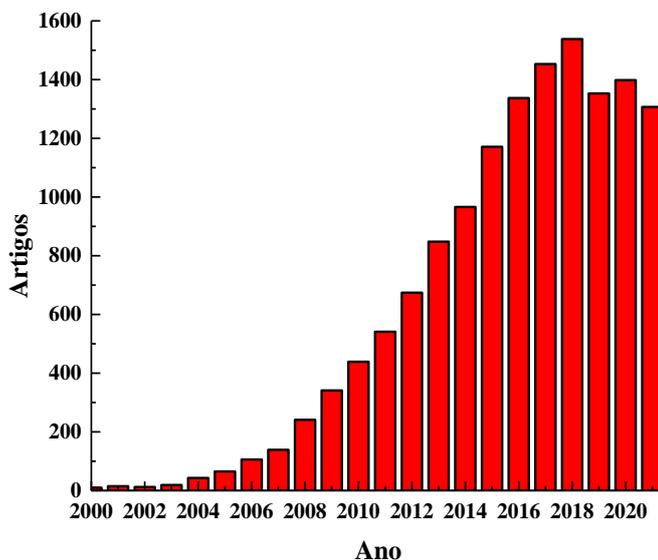
## 2.1 Nanopartículas de sílica carreadoras de fármacos

Materiais baseados em sílica ganham cada vez mais destaque devido a suas propriedades, tais quais: estabilidade térmica, resistência mecânica e inércia frente a ataques de agentes químicos[5–8]. Na literatura são observadas diversas modificações em superfície de materiais a base de sílica[9–14], decorrente da presença de sítios ativos com elevado índice de ordenação na superfície externa e interna[15,16]. Especial atenção vem sendo dada às sílicas mesoporosas, pois possuem elevada área superficial e grau de ordenamento de poros[10] e por apresentarem estrutura com tamanhos de poros entre 2 a 50 nm.

Por todas essas particularidades é que os materiais à base de sílica mesoporosa são estudados para diversas aplicações, tais como: remediação ambiental[17], cromatografia[18], biosensores[19], sistemas catalíticos[20], proteção de corrosão[21] como também as aplicações na área de medicina[22], como diagnóstico de imagem[23], reconstituição óssea[24] e carregamento de fármacos[25,26]. Além disso, o uso de materiais de óxido de silício é aceito pela U.S. Food and Drug Administration[27], sendo classificado como "Geralmente Reconhecida como Segura" (GRAS) e usado em cosméticos e aditivos alimentares[28], tornando-se assim, de grande interesse em aplicações medicinais. A importância deste tema fica mais evidente no Gráfico 6, que relaciona o quantitativo de publicações, disponíveis no ISI web

of Science, com uma pesquisa relacionando com “sílica” e “drug delivery” vêm aumentando a cada ano, refletindo a importância de estudos para esse tipo de aplicação.

**Gráfico 6.** Gráfico mostrando o número de publicações envolvendo as palavras-chave: “sílica” e “drug delivery”, realizado na ISI web of Science em 25.04.22.

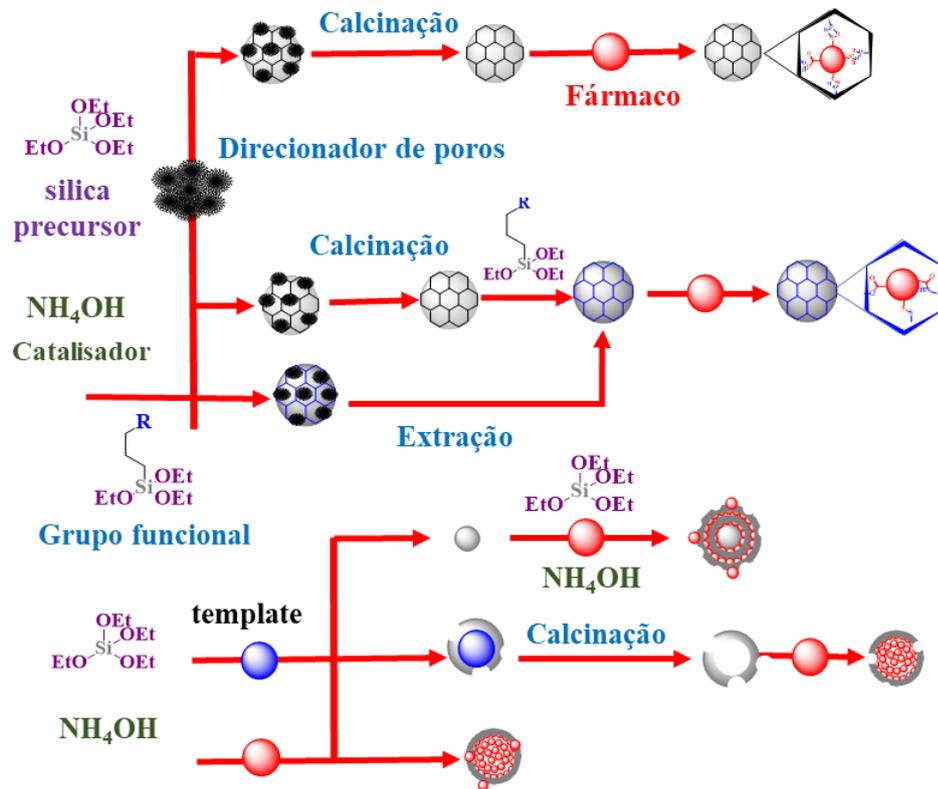


Fonte: O autor

Devido sua versatilidade e a sua alta área superficial os materiais de sílica incorporam quantidades significativas de diversas moléculas de fármacos. Diversas metodologias têm sido utilizadas, de acordo com a necessidade e especificidades: (I) utilização ou não de direcionador de poros ou outros templates, (II) remoção do direcionador de poros via extração ou calcinação, (III) funcionalização via condensação ou enxerto ou revestimento e as possíveis combinações desses procedimentos (Gráfico 7). Esses procedimentos visam melhorar o carreamento e direcionamento desses materiais a regiões específicas, tais como células neoplasiaígenas. Devido as configurações estruturais dos poros e as interações da superfície com os fármacos, a sílica pode proporcionar uma liberação lenta e controlada, diminuindo o número de doses e a quantidade de fármaco administrado.

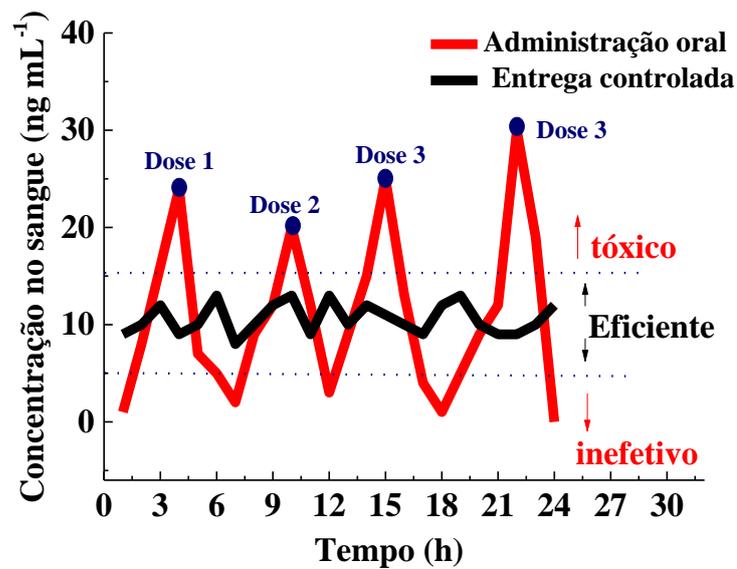
Nanoplateformas de sílica possuem boa biotranslocação, entrando em tecidos e atravessando a parede celular e, por apresentarem baixa toxicidade, tornam-se fortes candidatos em aplicações terapêuticas [29]. O Gráfico 8 mostra o processo administração convencional de fármaco (Gráfico 8a) onde se observa picos de altas e de baixa concentração em contraste com a administração via liberação controlada (Gráfico 8b), em que a concentração do fármaco se mantém praticamente constante dentro de níveis benéficos [30].

Gráfico 7. Funcionalização de materiais de sílica

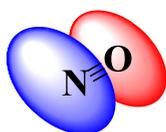


Fonte: O autor

Gráfico 8. Efeito na administração convencional e por liberação controlada.



Fonte: Adaptado Graham et al (2018)



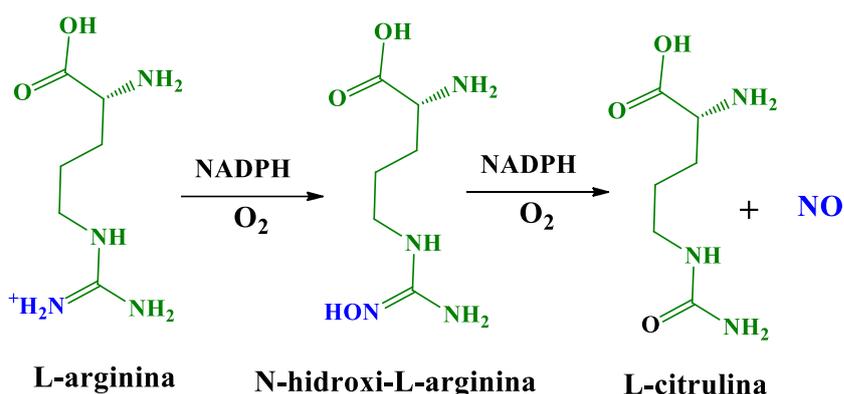
## Óxido Nítrico

### 2.2 A importância do Óxido Nítrico

O óxido nítrico, também conhecido por monóxido de nitrogênio ou monóxido de azoto é um gás solúvel de fórmula química NO produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios. Por muito tempo acreditava-se que o óxido nítrico (NO) fosse apenas uma substância nociva que em grandes concentrações causava danos ao meio ambiente. Porém na década de 1980, descobertas sobre a bioquímica do NO começaram a modificar esse conceito[31]. Devem-se destacar quatro descobertas que tiveram grande repercussão e aumentaram o interesse pela bioquímica do óxido nítrico:

- O envolvimento do NO em vários processos biológicos, incluindo vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e comunicação neural;
- A ativação da enzima guanilato ciclase, que catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP);
- O efeito citotóxico do óxido nítrico após ser eliminado por macrófagos ou por outras células do sistema de defesa dos seres vivos;
- A produção endógena do NO a partir da conversão do aminoácido L-Arginina por um mecanismo enzimático (Gráfico 9), que envolve uma família de enzimas denominadas Óxido Nítrico Sintase (NOS)[32].

**Gráfico 9.** A produção endógena do NO a partir da conversão do aminoácido L-Arginina.

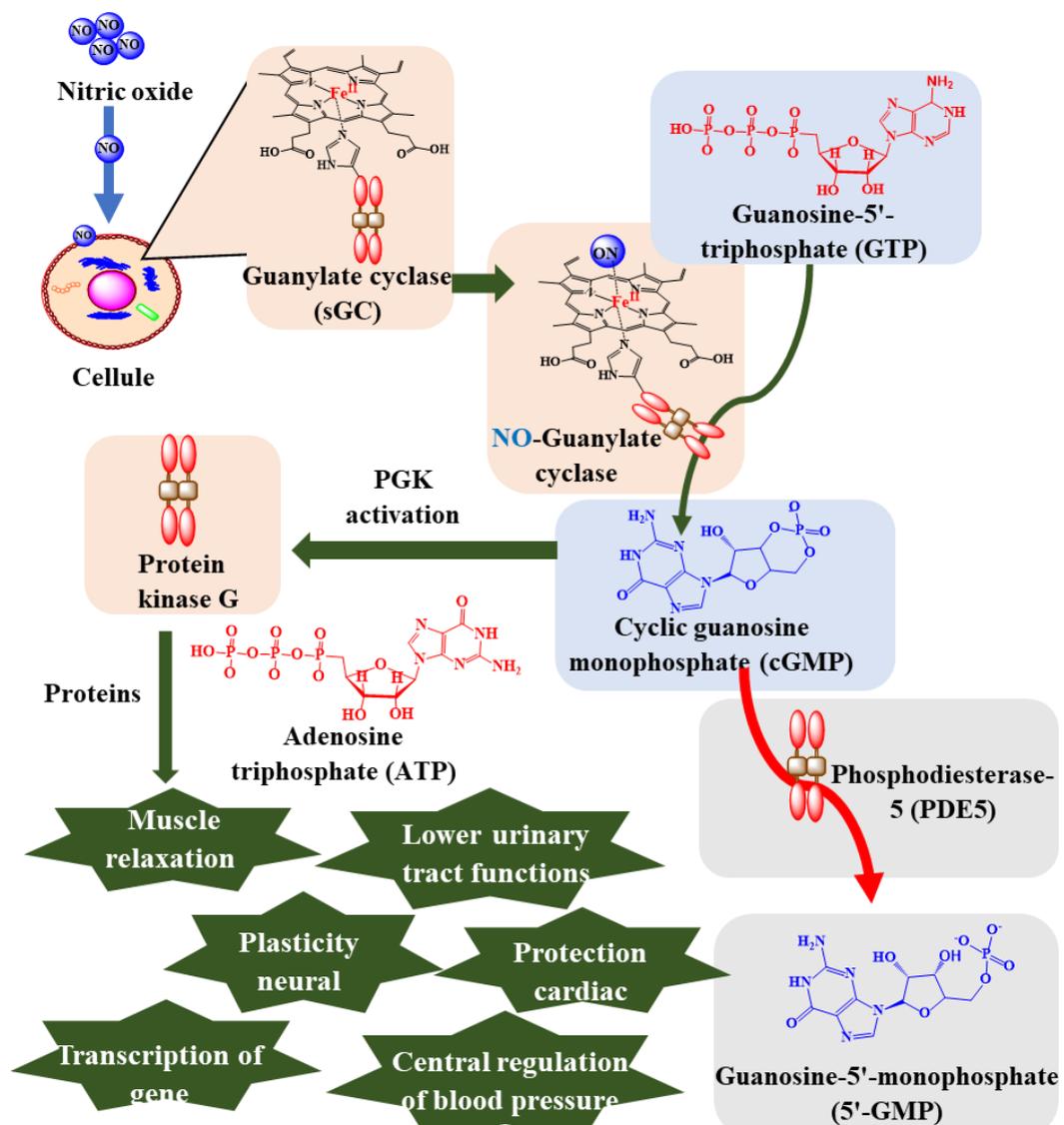


Fonte: Adaptado de Wimalawansa (2000)

O NO quando presente no interior da célula muscular liga-se ao íon Fe<sup>2+</sup> do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GCs), causando alteração na conformação da enzima e ativando-a (GCa). A GCa é capaz de catalisar a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP) que ativa a proteína quinase G (PKG)[33]. A

PKG atua na fosforilação de vários alvos biologicamente importantes, agindo em diferentes funções: regulação do relaxamento do músculo liso[34], função plaquetária[35], metabolismo do espermatozóide[36], divisão celular[37] e síntese de ácidos nucleicos[38]. Porém, em paralelo, o cGMP é hidrolisado pela enzima fosfodiesterase (PDE-5) a 5'GMP que é inativo[39](Gráfico 10).

**Gráfico 10.** Representação da atuação da molécula de NO no organismo.

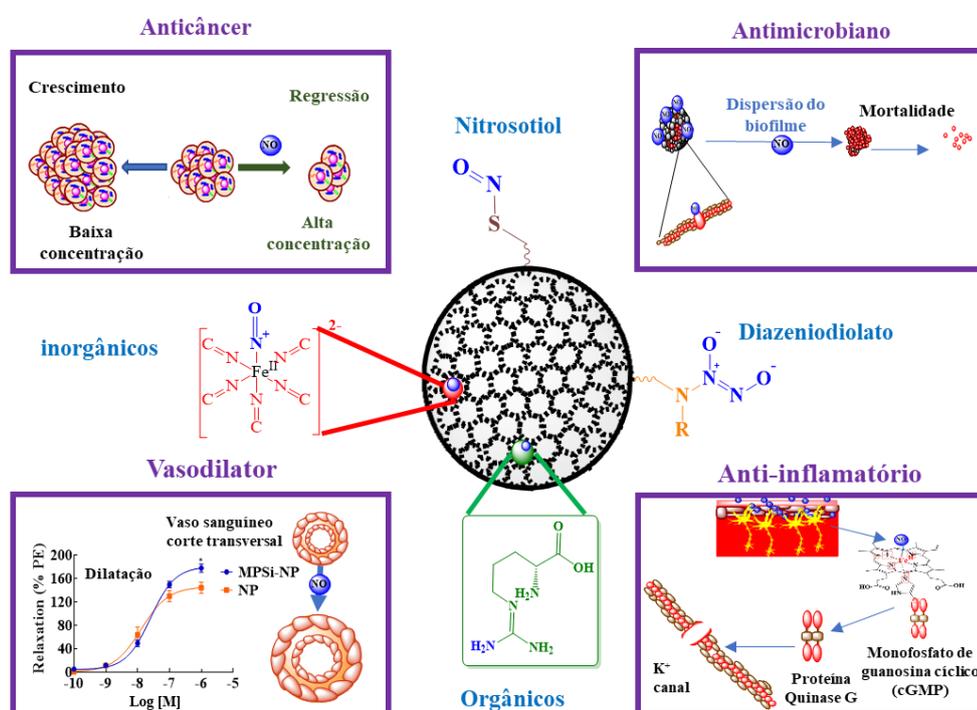


Fonte: O autor

## 2.3 Nanoplaformas de sílica liberadoras de óxido nítrico

Diferentes plataformas transportadoras/doadoras de NO têm sido desenvolvidas, em parte para minimizar os efeitos de sua alta reatividade [40]. Dentre essas plataformas destacam-se carreadores à base de sílica contendo principalmente, diazeniodiolatos (NONOate), S-nitrosothiols e ancoramento de compostos orgânico e inorgânicos liberadores de óxido nítrico [41–48] para tratamentos de feridas, ação antineoplásico, tratamento de hipertensão, dentre outros, conforme resumido no Gráfico 11.

**Gráfico 11.** Principais fontes de entrega e transporte de óxido nítrico em sílica.



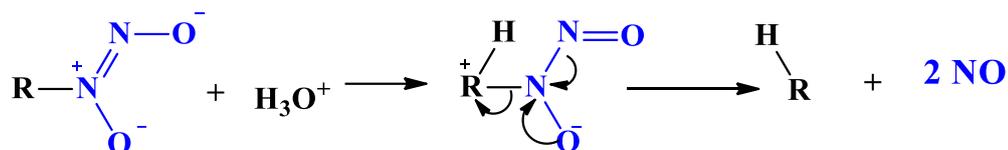
Fonte: o autor

### 2.3.1 Principais plataformas de sílica liberadoras de NO e tratamentos terapêuticos

#### 2.3.1.1 Plataforma de sílica contendo diazeniodiolatos (NONOate)

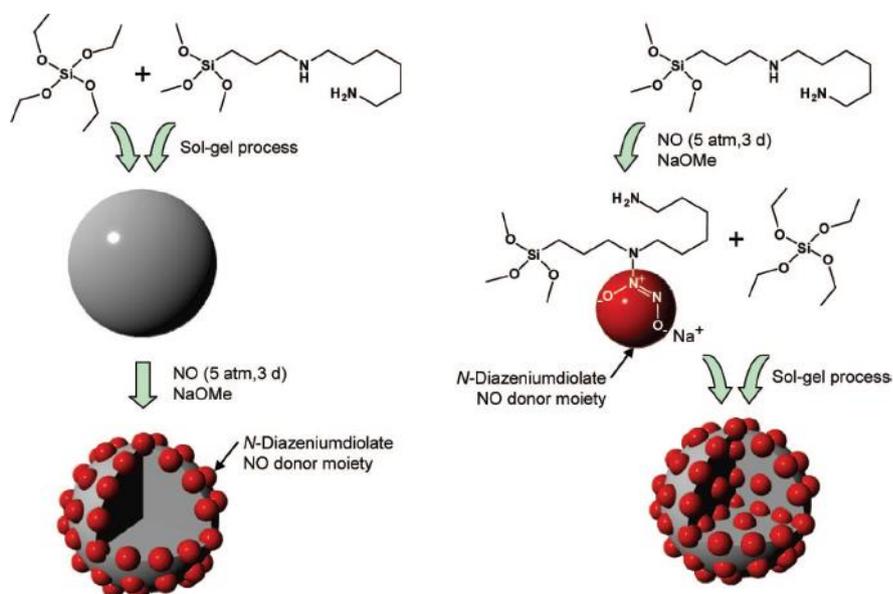
Os diazen-1-ium-1,2-diolatos, comumente chamados de diazeniodiolatos, são compostos contendo dois átomos de oxigênio e dois átomos de nitrogênio  $[N(O)-NO]^-$ , sendo o grupo N=N (diazen) com carga positiva e dois átomos de oxigênio com carga negativa. Os Diazediolatos são capazes de liberar óxido nítrico em meio biológico[49–51] (Reação 1).

Reação 1-Diazeniodiolatos e a mecanismo de liberação de NO em pH neutro.



Sílicas contendo diazeniodiolatos são preparadas utilizando N-[3-(trimetoxissilil)propil] etilenodiamina via condensação ou enxerto, os quais são expostos a alta pressão de NO em meio básico, formando N-Diazeniodiolatos [52] (Gráfico 12).

**Gráfico 12.** Síntese de liberadores de óxido nítrico via diazeniodiolatos em materiais de sílica.



Fonte: Shin et al. (2008)

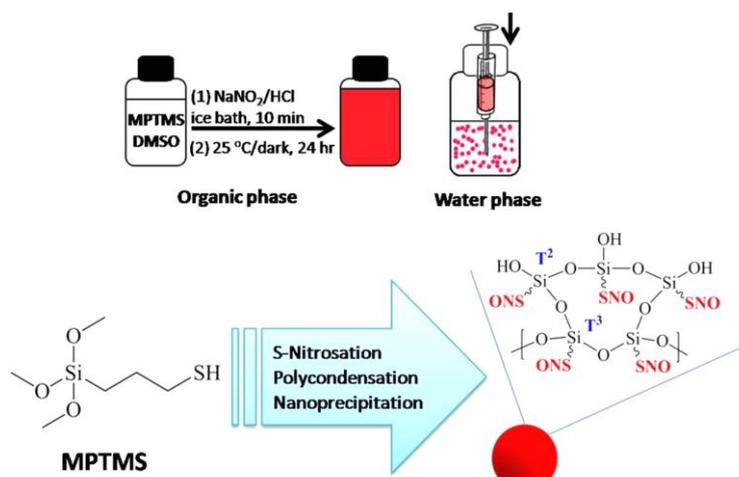
A vantagem de sistemas como estes é a alta capacidade de armazenamento de cargas de NO, e a capacidade de liberar NO em pH próximo ao pH do meio fisiológico (~7,0). No entanto, a preparação desse tipo de material geralmente requer NO gasoso sob alta pressão [41,43,53–55], o que encarece o processo e o torna perigoso, prejudicando assim sua viabilidade econômica. Além disso, N-nitrosaminas que podem ser formadas durante a síntese, são suspeitas de causar câncer [56,57].

### 2.3.1.2 S-nitrosotiois

Os S-nitrosotiois são compostos constituídos por ligações moleculares entre tiol e óxido nítrico (S-NO), são encontrados em tecidos e exibem atividade mimética de NO. São amplamente utilizados como armazenamento e/ou transporte de NO [58]. A adição de grupos

SH pode ser realizada pela incorporação de agente sililante como o mercaptocoxissilano com posterior adição de óxido nítrico [59,60] (Gráfico 13). Outra forma é a polimerização superficial de polímeros contendo grupos tióis, com posterior adição de NO [60].

**Gráfico 13.** Funcionalização de sílica através de compostos mercaptocoxissilano.

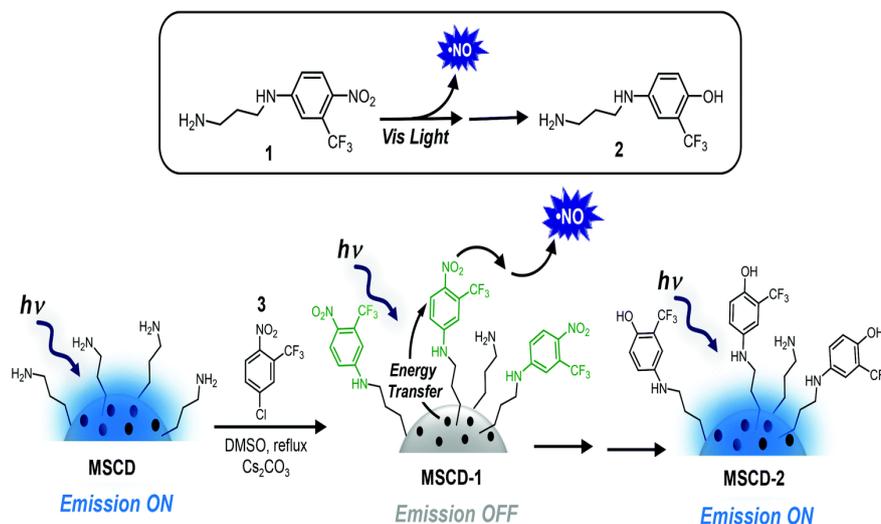


Fonte: Ferro et al (2012)

### 2.3.1.3 Compostos inorgânicos e orgânicos

Os principais compostos orgânicos liberadores de NO são os nitrocompostos e os nitrosocompostos, ou a própria L-Arginina. São incorporados por processo de funcionalização superficial da sílica e através de ligações covalente (Gráfico 14) ou adsorção por interações eletroestática[61,62].

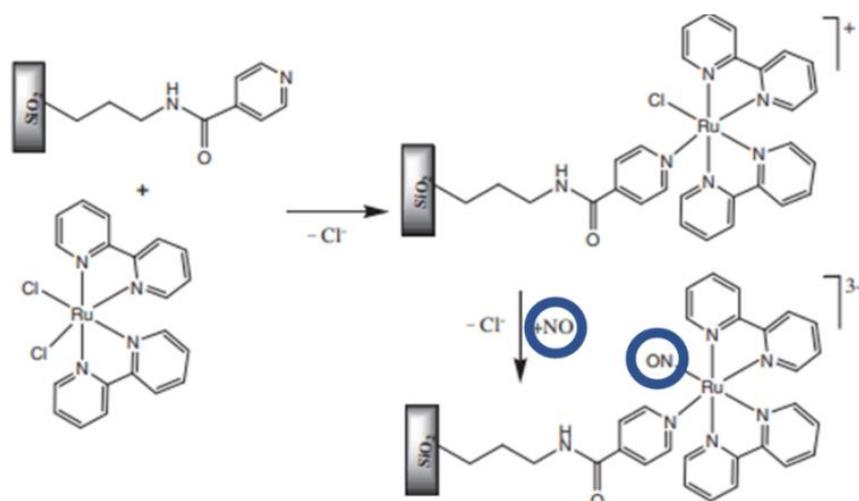
**Gráfico 14.** Exemplo de utilização de compostos orgânicos para liberação de NO



Fonte: Afonso et al. (2017)

Os principais composto inorgânicos utilizados são os compostos de coordenação liberadores de NO os quais são incorporados por sequencias de processo de funcionalização superficial da sílica e através de ligações covalente de ligação (Gráfico 15) ou adsorção por interações eletroestática [63–66]. Destaque-se também o uso de nitritos e nitratos[67].

**Gráfico 15.** Exemplo de possíveis fixações de complexo liberadores de NO.



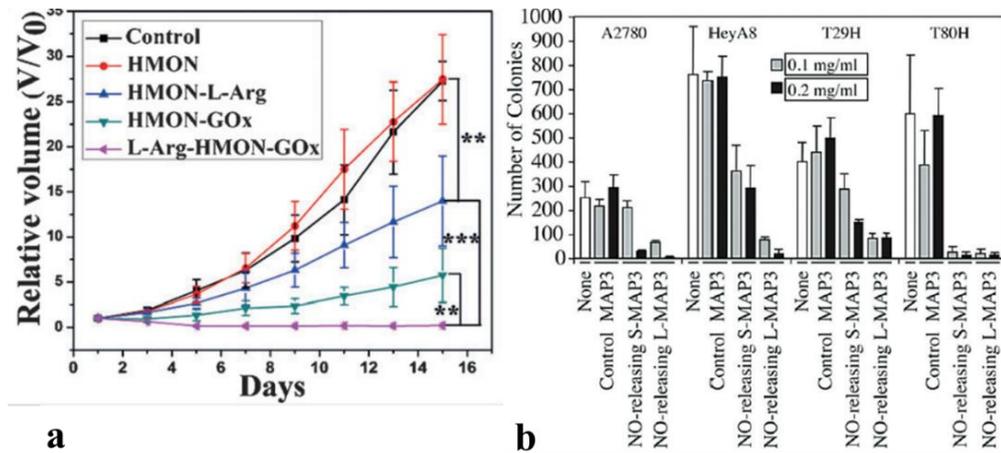
Fonte: Gorzoni et al (2007)

## 2.3.2 Principais aplicações terapêuticas de plataformas de sílica liberadora de NO

### 2.3.2.1 Antineoplásico

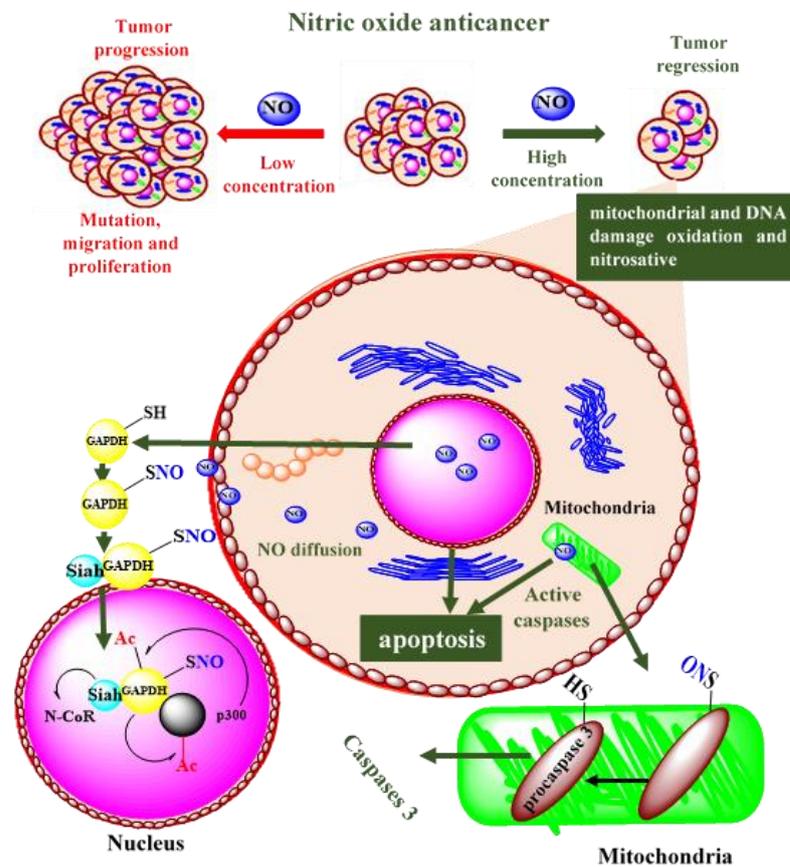
Em elevadas concentrações o NO produz espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a estresse nitrosativo, desaminação do DNA, nitrosação de enzima, prejudicando as funções celulares, inibindo a respiração celular e causando a apoptose celular[68]. Foi observado que a geração de ROS induzir a desglutacionilação, clivagem e ativação da caspase-8 que ativa a pró-caspase-3 causando a apoptose celular [69]. Além disso, o NO afeta o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima glicolítica e considerada como um gene constitutivo, esta enzima é, na verdade, rigidamente regulada e é envolvido em inúmeras funções celulares. A GAPDH é afetada por oxidação em seu resíduo Cys sendo inibida quando sofre S-nitrosilação e afeta a função glicolítica levando a morte celular. [70]. Além disso, S-nitrosilação aumenta a sua ligação a Siah estabilizando-a e facilita a degradação de substratos nucleares e leva a morte celular[71] (Gráfico 16 e 17).

**Gráfico 16.** Exemplos de ação Antineoplásico de sílica liberadoras de NO. a) Curva de crescimento do tumor de acordo de nanopartículas mesoporosas ocas (HMON), com entrega de glicose oxidase (GOx) e L-Arginina. b) Crescimento de células de ovário neoplasiaosas (A2780 e e HeyA8) e células de ovário transformado [T29 H-Ras (G12V) e T80 H-Ras (G12V)] na presença de sílica liberadora de NO (MAP com diazeniodiolatos).



Fonte: Fan et al. (2017) e Stevens et al. (2010)

**Gráfico 17.** Esquema de ação do ROS produzidos a partir de NO.



Fonte: O autor

O uso de sílicas liberadoras de NO vem ganhando destaque para tratamento Antineoplásico, por exemplo, o uso de nanopartículas mesoporosas ocas (HMON) com entrega de glicose oxidase (GOx) e L-Arginina tem ação Antineoplásico (Graf. 16a) [61]. Também foi observado que sílica-diazeniodiolatos apresentaram ação antineoplasiaígena contra diferentes linhagens de células ovarianas (Graf. 16b) [72].

Para além, materiais de sílica utilizando entrega combinada de cisplatina e NO (diazeniodiolatos) indicaram igual toxicidade para sílica carregada com cisplatina e sílica carregada com cisplatina e NO em células normais, porém, a toxicidade para células tumorais de pulmão, as sílicas-cisplatina-NO foram significativamente maiores.

### 2.3.2.2 Ação antimicrobiana

Nanopartículas contendo diazeniodiolatos, apresentam atividade contra biofilme de microrganismo, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*. Trabalhos na literatura de viabilidade reportam 99% de redução de células de cada tipo de biofilme causados por liberação de NO, com a maior eficácia (99,999%) contra *P. aeruginosa* gram-negativa e *E. coli* biofilmes (Tabela 01) [41].

**Tabela 1.** Resultados reportados [41] com base em log e reduções percentuais na viabilidade das células em biofilmes na dose mais alta de nanopartículas de sílica de NO testadas (8 mg/mL) versus brancos (0 mg/mL nanopartículas).

Espécies	Classificação	Redução de log	Redução (%)
<i>P. aeruginosa</i>	Gram-negativo	5	99,999
<i>E. coli</i>	Gram-negativo	5	99,999
<i>S. aureus</i>	Gram-positivo	2	99
<i>S. epidermidis</i>	Gram-positivo	2	99
<i>C. Albicans</i>	fungo	3	99,9

Fonte: Adaptado de Kafshgari et al. (2016)

### 2.3.2.3 Tratamentos de feridas

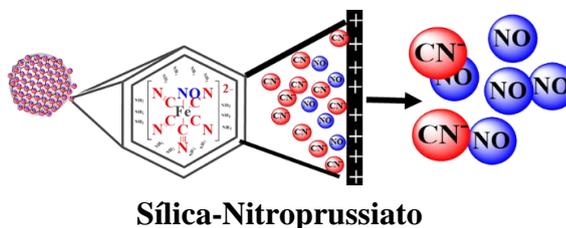
Estudos de Martinez reportam a atuação de NO no processo de cicatrização de feridas e úlceras, além da atuação antimicrobiana. [67] Uso de nanopartículas liberadoras de NO através de nitrito apresentaram atividade anti-inflamatória e cicatrizante (Gráfico 18), os quais diminuíram a inflamação supurativa, carga bacteriana mínima e redução da degradação

do colágeno. Com este resultado, os autores demonstram o potencial do material para ser utilizado como uma nova classe de antimicrobianos aplicados topicamente para o tratamento de infecções e feridas.

**Gráfico 18.** Taxa de cicatrização para sílica liberadoras de NO feridas sem e com infecção bacteriana causada por *Staphylococcus Aureus* Resistente à Meticilina (MRSA).



Fonte: Adaptado de Martinez et al (2009)



## 3 CAPÍTULO 2. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO NITROPRUSSIATO COMO LIBERADOR DE NO

### 3.1 Introdução

#### 3.1.1 Nitroprussiato

Apesar da grande importância do óxido nítrico no tratamento de patologias, há apenas 3 medicamentos liberadores de NO no mercado: o nitroprussiato de sódio, de uso restrito em hospital; o dinitrato de isossorbida, indicado para tratamento da dor isquêmica cardíaca associada à insuficiência coronariana, seu uso pode causar cefaleia vascular, vasodilatação cutânea com eritema, vertigens, fraqueza, náusea, vômito, insônia, palidez e sudorese; o mononitrato de isossorbida, utilizado em tratamento de ataque da insuficiência coronária, insuficiência cardíaca aguda ou crônica, angina de esforço, de repouso e pós-infarto e seu uso pode causar cefaleia, hipotensão e náusea. Há também 3 fármacos promissores, porém ainda não aprovados pelo FDA: o molsidomine (1978) para tratamento de angina; o Linsidomine atua como vasodilatador e o Naproxcinod (1994) de ação anti-inflamatória. O nitroprussiato de sódio, exerce função vasodilatadora devido a presença do grupo nitroso, que quando entra em contato com eritrócitos, sofre decomposição, liberando óxido nítrico, que dilata as arteríolas e vênulas.

Desde 1950 o nitroprussiato é utilizado em tratamentos em curto prazo e em casos graves de hipertensão[73]. Quando interage com grupos sulfidril[74] (Gráfico 19) das hemácias e da parede vascular, há liberação dos íons cianetos e óxido nítrico, este agindo como vasodilatador direto[75].

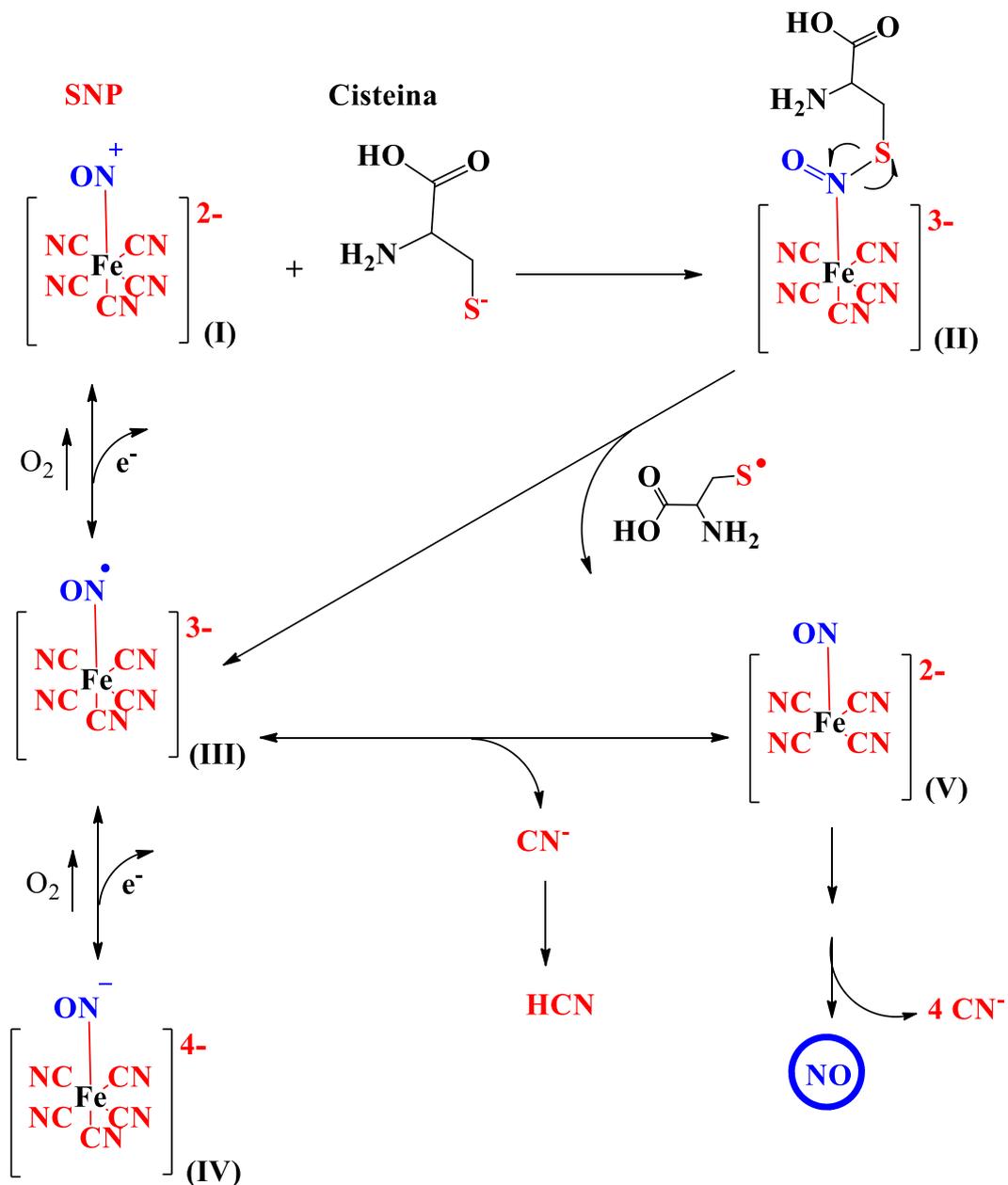
A toxicidade do íon cianeto no organismo é conhecida há mais de dois séculos[76] sendo as principais vias de atuações:

I- Coordenação com o  $Fe^{2+}$  da hemoglobina formando a cianohemoglobina bloqueando a recepção e transporte de oxigênio no sangue[77].

II- ligação preferencial ao  $Fe^{3+}$  da enzima citocromo oxidase mitocondrial (citocromo a-a<sup>3</sup>) reduzindo os níveis de oxigênio nos tecidos, impossibilitando a síntese de ATP na cadeia respiratória. Apesar de um amplo suprimento de oxigênio, as células não podem utilizar o oxigênio por causa de sua cadeia de transporte de elétrons envenenada, causando uma hipóxia funcional ou histotóxica (Gráfico 20).

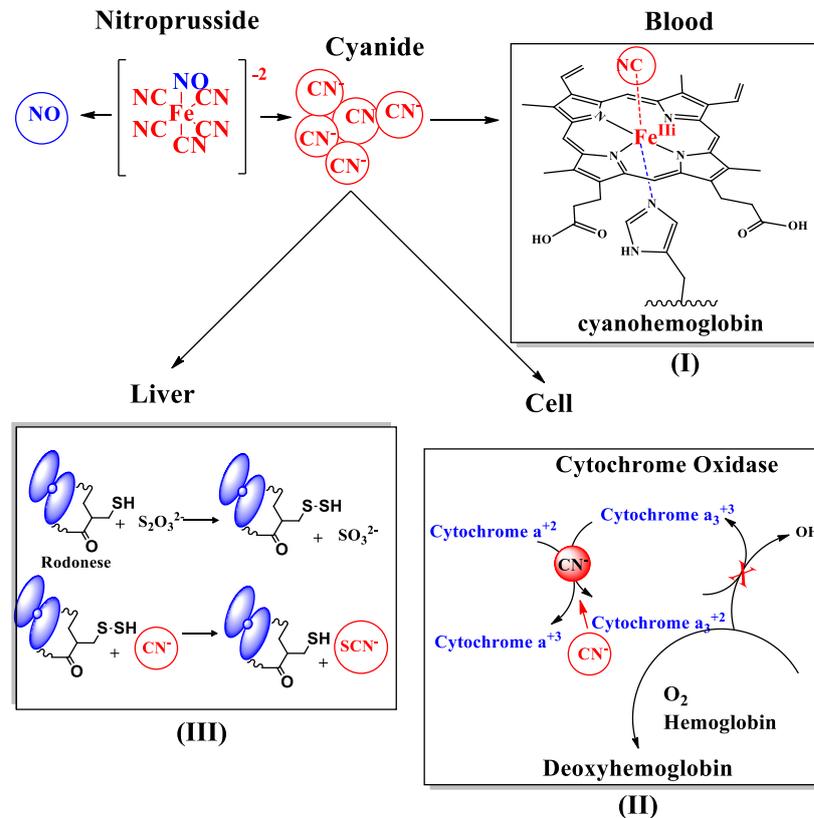
III- O cianeto é metabolizado no fígado pela enzima rodanase junto com uma fonte de enxofre, e.g. tiosulfato, para formar tiocianato, um composto relativamente atóxico, que é eliminado por excreção renal.

**Gráfico 19.** Mecanismo mais aceito para liberação de NO e cianeto do nitroprussiato. Decomposição do nitroprussiato em NO. O nitroprussiato (I) é reduzido diretamente a (II) pelas hemoproteínas, etc., ou indiretamente via (II) pelos tióis. O caminho que leva à liberação de NO é (I) → (III) → (IV) → NO



Fonte: Tinker e Michenfelder (1976)

**Gráfico 20.** Toxicidade relacionada ao cianeto no organismo

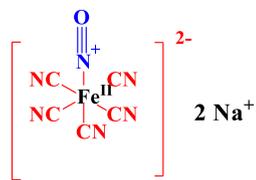
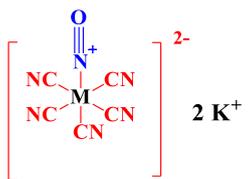
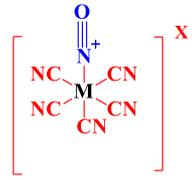


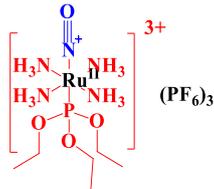
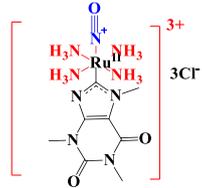
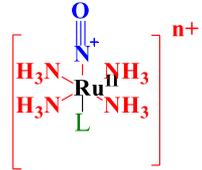
Fonte: Adaptado de kruszyna et al. (1974), Zoltani (2015) e Zimmerman (2011)

O nitroprussiato, com nome comercial de Nipride®, é administrado na forma de infusão endovenosa e de uso restrito em hospitais e é recomendado para tratamento de infarto agudo do miocárdio, doença valvular mitral e aórtica, cardiomiopatia, e tratamento intra e pós-operatório em cirurgia cardíaca. A dose usual é de 0,5 a 10 mcg/kg/min, porém a infusão nesta taxa não deve ultrapassar 10 min, pois pode causar um significativo aumento da taxa de íons cianeto, podendo atingir níveis tóxicos e potencialmente letais, exceto quando administrado por breves períodos ou em baixas doses (< 2mcg/kg/min.). Por isso, estudos para avaliar a capacidade adsorviva de nitroprussiato em nanoplateformas como as nanopartículas de sílica, de modo a avaliar a liberação de óxido nítrico e as formas de redução da quantidade de cianeto liberada são de grande relevância.

O nitroprussiato vem sendo utilizado com fármaco desde 1950, porém, não era o único composto inorgânicos de nitrosila conhecido[78], mesmo assim, até hoje, continua sendo único a ser validado e utilizado como fármaco. Devido a relevância e importância terapêuticas do NO, muitas pesquisas ainda são desenvolvidas buscando compostos de coordenação liberadores de NO (Tabela 2).

**Tabela 2.** Alguns destaques no desenvolvimento de liberadores de NO a partir da descoberta do nitroprussiato.

ano	Estrutura	Comentário
1849	 <p>Nitroprussiato</p>	Descoberta do nitroprussiato
1858	 <p>Sal preto de Roussin</p>	Atividade antibacteriana [79]
1950	Nitroprussiato	Uso em medicina
1974	 <p>Complexos de Pentacianonitrosil (M=Fe, Mn, W and Mo)</p>	Os complexos pentacianonitrosil de manganês, tungstênio e molibdênio são ineficazes para inibir a agregação plaquetária [80]
1980	 <p>[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>NO]Cl<sub>3</sub></p>	Relaxamento do músculo liso vascular [81]
1991	Nitroprussiato	Limitações no uso de nitroprussiato
1998	 <p>Complexos de Pentacianonitrosil (M=Fe, Ru, Cr and V)</p>	Efeitos Bactericidas [82]
2002	 <p>trans-[RuCl(NO)(cyclam)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub></p>	hipertensão[83]

2002	 <p style="text-align: center;">trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>P(OEt)<sub>3</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub></p>	Propriedades hipotensivas [84]
2008	 <p style="text-align: center;">trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(caffeine)(NO)]Cl<sub>3</sub></p>	Relaxamento do corpo cavernoso do coelho [85]
2009	 <p style="text-align: center;">trans-[Ru(NO)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L]<sup>n+</sup>, no qual (L) é N-heterocyclic, H<sub>2</sub>O, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, ou triethylphosphite</p>	Quimioterapia contra infecção por Trypanosoma cruzi [86]
2013	 <p style="text-align: center;">cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>)</p>	Inibe a dor inflamatória [87]
2015	cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> (SO <sub>3</sub> )(NO)](PF <sub>6</sub> )	Proteção da mucosa gástrica [88]
2015	Complexos de [Ru(bpy) <sub>2</sub> L(NO)](PF <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> (L = Imidazole, 1-Methylimidazole, Sulfite and Thiourea)	Agentes fotodinâmicos terapêuticos [89]
2016	 <p style="text-align: center;">[Ru(bpy)<sub>2</sub>Imn(NO)]<sup>+3</sup></p>	Relaxante em corpos cavernosos humanos [90]
2019	cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> (SO <sub>3</sub> )(NO)](PF <sub>6</sub> )	Atividade leishmanicida [91]
2020	 <p style="text-align: center;">(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub></p>	Atividade antiangiogênica [92]

trans-[Fe(cyclam)(NO)Cl]Cl<sub>2</sub>  
(cyclam = 1,4,8,11-  
tetraazacicotetradecano)

2020

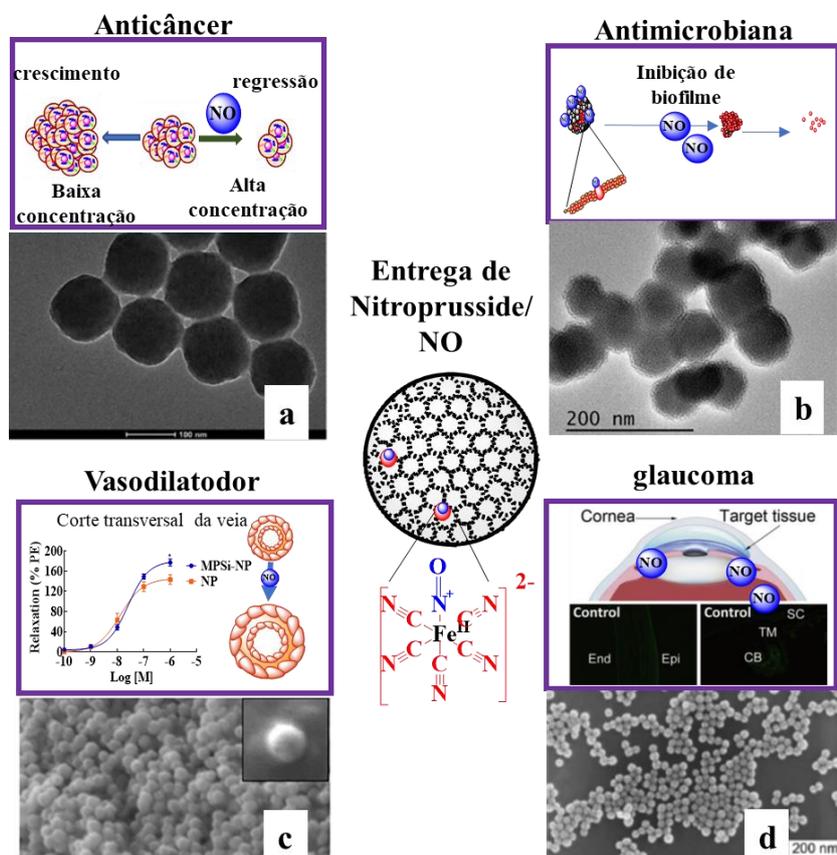
cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(Imn)(NO)]<sup>3+</sup>

Potencial anti-hipertensivo [93]

Fonte: O autor

Trabalhos recentes utilizam carreadores de fármacos para entrega de nitroprussiato ou liberação de NO presente no nitroprussiato e são voltados para reduzir sua toxicidade, visando aplicações terapêuticas tradicionais do nitroprussiato e novos tratamentos, e.g. tratamento de glaucoma, ação antibacteriana, tratamento de hipertensão e ação Antineoplásico (Gráfico 21).

**Gráfico 21.** Algumas aplicações de nanoplataformas contendo nitroprussiato: a) (MPSi-NP) para hipertensão e doenças cardiovasculares [94], b) nanotransportadores de azul da Prússia mesoporoso, dopado com nitroprussiato de sódio e docetaxel (DTX @ m-PB-NO) para tratamento Antineoplásico [95], c) nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com nitroprussiato de sódio (SNP @ MSNs) para glaucoma [96,97] e d) Nitroprussiato (MPSi-NP) contendo nanopartículas de sílica (MPSi-NP) para ação antibacteriana[98].



Fonte: Silva Filho et al. (2019), Feng et al. (2019), Silva Filho et al. (2021) e Hu et al (2021).

### 3.1.2 Aplicações de nanoplataformas contendo nitroprussiato

Trabalhos recentes, mostrando que o óxido nítrico (NO) pode reduzir a pressão intraocular (PIO) ao direcionar a via de saída convencional, têm atraído muita atenção. Em um estudo relativamente recente, um colírio tópico para uso prolongado contendo nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com nitroprussiato de sódio (SNP@MSNs) mostrou ser capaz de reduzir a pressão intraocular (PIO) com doses baixas de nitroprussiato de sódio. O estudo mostrou que a viabilidade de células epiteliais da córnea humana tratadas com SNP@MSNs ( $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reduz significativamente a viabilidade celular (~60%), sendo, portanto, promissor para regular a PIO em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto e hipertensão ocular [65] e, abrindo novas possibilidades de pesquisas nesse campo

Em outro estudo, nanopartículas esféricas mesoporosas (MNPs) foram usadas com entregadores de SNP (MNP-SNP) para relaxamento do vaso sanguínea, levando a um rápido relaxamento dos vasos aórticos, sendo este sustentado por 3 horas [99]. Ao revestir as MNP com titânia (TiMSN-SNP), os autores observaram um relaxamento mais lento e mais sustentado do que o material não revestido [100].

Nanocarreadores mesoporosos de azul da Prússia dopado com nitroprussiato de sódio (m-PB-NO) e docetaxel (DTX) foram recentemente desenvolvidos e mostram liberação de NO controlado por infravermelho próximo (NIR) e liberação simultânea de NO e de DTX, inibindo a metástase pulmonar de câncer de mama 4TI [95]

Nos últimos 20 anos grupos têm desenvolvido liberadores de NO para diversas aplicações, tais como: Relaxamento do corpo cavernoso do coelho [85], inibição da dor inflamatória [87], atividade antiangiogênica [92], atividade leishmanicida [91], relaxante em corpos cavernosos humanos [90], potencial anti-hipertensivo [93]. Apesar desses esforços, até agora, o único complexo inorgânico liberador de NO permitido pela FDA é nitroprussiato, por isso, diante disso, surgem os carreadores para tentar derrubar as barreiras do uso de nitroprussiato.

## 3.2 Objetivos

### 3.2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a liberação de óxido nítrico e cianeto em nanopartículas contendo nitroprussiato de sódio (MPSi-NP).

### 3.2.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar nanopartículas contendo nitroprussiato de sódio (MPSi-NP) pelo método Stöber modificado e caracterizar o material obtidos quanto sua morfologia;
- Quantificar nitroprussiato incorporado nas nanopartículas.
- Quantificar o total de óxido nítrico e cianeto que pode ser liberado das MPSi-NP sob a incidência de luz de LED azul.

### 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais estão listados na Tabela 3, juntamente com as respectivas procedências.

**Tabela 3.** Lista de reagentes e solventes utilizados

Reagentes	Procedência	Pureza
Tetraetilortosilicato (TEOS)	Sigma-Aldrich	98%
Brometo de N-Cetil-N,N,N-trimetilamônio (CTAB)	Sigma-Aldrich	P. A
3-Aminopropiltrióxissilano (APTES)	Sigma-Aldrich	98%
Hidróxido de Amônia	Synth	27%
Acetona	Synth	
Ácido Clorídrico	Synth	65 %
Etanol-Dinâmica	Synth	98,5%
Nitroprussiato	Sigma-Aldrich	P. A
Reagente de Griess tampão PBS		

Fonte: O autor

#### 3.3.2 Nanopartículas de sílica mesoporosa com nitroprussiato

##### 3.3.2.1 Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa (MPSi)

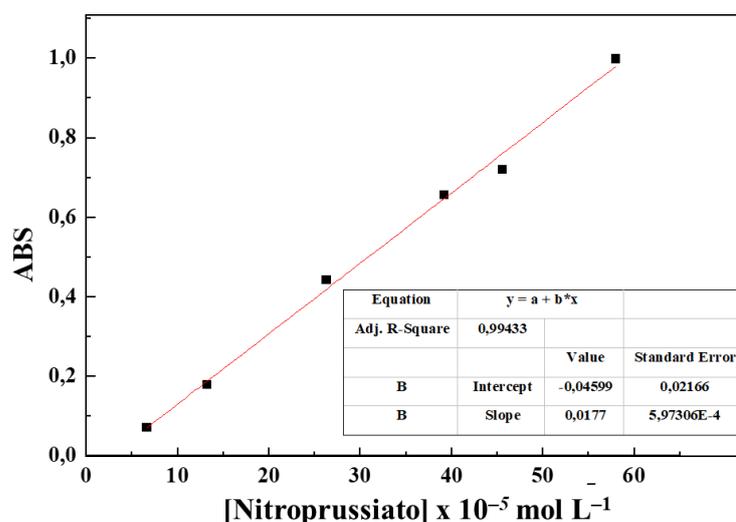
Para a síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa seguiu-se o procedimento descrito na literatura por Silva Filho et al. [48]. Assim, 0,1 g de CTAB foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e adicionado 1 mL de hidróxido de amônio concentrado e mantido em ultrassom durante 15 min. Em seguida, 10 mL de uma solução etanólica contendo 1 mL de TEOS e 10 mL de solução alcoólica contendo 1 mL de APTES foram adicionados alternadamente à solução sob sonicação e mantidas no banho ultrassônico por 15 min. O material obtido foi lavado com uma mistura de etanol /água (1:1) três vezes e, finalmente, 1 vez com acetona, e seco por 24 h a 60 °C em estufa. O surfactante foi removido das MPSi por extração ácida usando 0,5 g das nanopartículas e 100 mL de uma mistura de etanol/ácido clorídrico (99:1 v/v), sendo a suspensão foi mantida em agitação durante 16 h a temperatura ambiente (~25 °C). Após, o material foi centrifugado, lavado com uma mistura de etanol/água (1:1) por três vezes e finalmente, 1 vez com acetona e seca por 24 h em estufa a 60 ° C.

##### 3.3.2.2 Preparação das nanopartículas contendo nitroprussiato (MPSi-NP)

Em um balão de reação contendo 50 mL de uma solução de nitroprussiato (0,5 mol L<sup>-1</sup>) foi adicionado 1 g de MPSi e mantido sob agitação por 24 h em temperatura ambiente e

protegido da luz. Após, o material foi centrifugado e lavado três vezes, sendo duas vezes com água e outra com acetona, e depois seco em estufa a 30 °C por 24 h. A quantidade de NP incorporado na MPSi foi avaliada por espectrofotometria em um espectrofotômetro UV-Vis Cary 5000 (Agilent) utilizando a curva de calibração  $0,0177[\text{NP}] - 0,04599 = \text{ABS}$  ( $[\text{NP}] \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) (Gráfico 22). Para esta análise foram utilizadas 4 mg de MPSi–NP dissolvidas em 5 mL de uma solução de NaOH 3 mol L<sup>-1</sup> e a absorbância foi medida em 398 nm.

**Gráfico 22.** Curva de calibração para o nitroprussiato em solução de NaOH 3 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor

### 3.3.3 Quantificação de cianeto (CN<sup>-</sup>) liberado das MPSi-NP

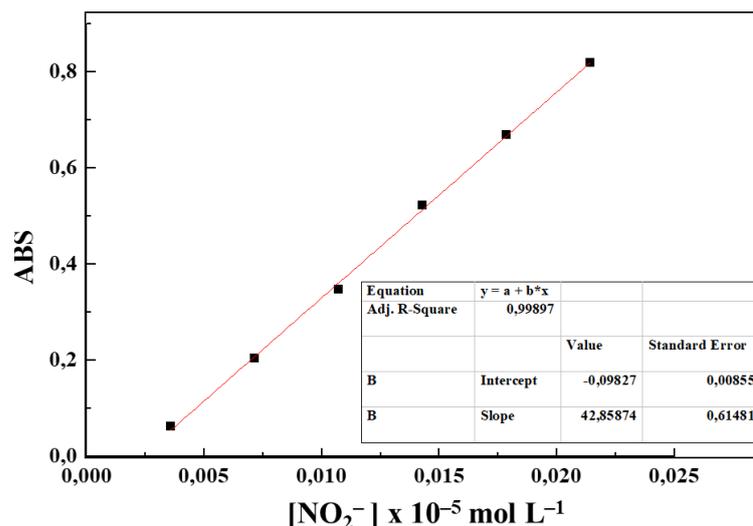
A quantificação do cianeto liberado das MPSi-NP foi realizada utilizando 4,5 mg de MPSi-NP dispersas em 10 mL de tampão PBS e a suspensão foi irradiada por 18 h. Após, centrifugou-se a dispersão e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,45 µm (Millex SLCR013NL). A solução foi então diluída para 100 mL e o cianeto livre na solução foi determinado por métodos padrão: 4500 CN–C (cianeto total após destilação) e 4500 CN–E (método colorimétrico), usando um Seal AutoAnalyzer 3 RH (Seal Analytical) As análises foram realizadas na Companhia Siderúrgica do Pecém (CSP).

### 3.3.4 Quantificação de óxido nítrico (NO)

A quantificação de NO foi realizada indiretamente por espectrofotometria, usando o reagente Griess que quantifica nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), espécie formada quando NO está presente em solução aeróbica. Assim, em um tubo de ensaio foi adicionado 100 mg de MPSi-NP disperso em 10 mL de PBS e a suspensão foi irradiada por 18 h em luz led azul, seguido de centrifugação

e filtração (filtro 0,45  $\mu\text{m}$ , Millex SLCR013NL). Após, 1 mL dessa solução foi diluída em água para um volume final de 10 mL e adicionado 0,40 mL do reagente de Griess. O nitrito formado foi quantificado utilizando a curva padrão  $ABS = 42,85 \times (\text{Concentração de } NO_2^-) - 0,098$  (concentração em  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) (Gráfico 23).

**Gráfico 23.** Curva de calibração para nitrito em solução PBS pH 7.2.



Fonte: O autor

### 3.3.5 Estudo de liberação de NO

A liberação de NO foi monitorado através da mudança na banda no espectro FTIR característica de NO (em  $1935 \text{ cm}^{-1}$ ) e/ou UV-vis e ensaio de Griess.

#### 3.3.5.1 Em pastilhas de KBr.

O estudo de liberação de NO foi realizado dispersando ca. 3% (m / m) de MPSiNP em KBr, então pressionado para 10 torr para fazer a pastilha e essa exposta a LED azul (450-495 nm) e espectros de IV foram coletados durante 84 horas de exposição.

#### 3.3.5.2 Em solução aquosa

Este estudo foi feito empregando 100 mg de MPSi-NP completamente disperso em 10 mL de água, e irradiado com LED azul (450-495 nm) por 18 h. Depois disso, o MPSi-NP foi centrifugado a 5000 rpm, lavado com água, etanol e acetona, e seco a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . O desaparecimento da banda em  $1935 \text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo NO foi acompanhado por IR e

outras mudanças foram monitoradas por espectroscopia Mössbauer no material sólido, bem como por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis das soluções sobrenadantes resultantes da centrifugação.

### **3.3.6 Caracterização**

#### *3.3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura*

Informações sobre a morfologia como: dispersabilidade, tamanho e forma das partículas foram obtidos através de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio QUANTA-FEG da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. Uma suspensão da amostra em etanol foi sonicada por 30 min e gotejada em um suporte de alumínio contendo tira de carbono, recoberta por filme de ouro (~20nm).

#### *3.3.6.2 Isoterma de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub>*

Para determinar as características texturais do material ao longo das etapas de funcionalização, utilizou-se um analisador por adsorção gasosa, modelo Autosorb-1C da Quantachrome Instruments. Os experimentos de adsorção/dessorção de nitrogênio foram realizados a temperatura do nitrogênio líquido (77 K), as amostras foram degaseificadas sob vácuo a 150 °C, durante 24 h. O volume e diâmetro dos poros foram calculados pelo método de Barret–Joyner–Halenda (BJH de dessorção) e a área superficial foi calculada usando o método de Brunauer–Emmett–Teller (BET)[101]. As análises foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade Federal do Ceará (LCTM-UFC) no Departamento de Física da UFC.

#### *3.3.6.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho*

Análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, sendo utilizadas pastilhas de KBr contendo 2% (m/m) da amostra. O equipamento utilizado foi da marca ABB, modelo FTLA 2000, localizado no Grupo de Bioinorgânica, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

#### *3.3.6.4 Espectroscopia Mössbauer*

As análises de Mössbauer foram realizadas antes e após o tratamento fotoquímico do MPSi–NP, cujos dados foram coletados em um espectrofotômetro em modo de aceleração constante, com uma fonte de radiação gama de <sup>57</sup>Co (Rh) à temperatura ambiente, 110 K e 20 K. Os dados de Mössbauer foram ajustados para funções Lorentzianas discretas, usando a rotina

de ajuste de mínimos quadrados do pacote de software NORMOS®. As análises foram realizadas no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFC.

### 3.3.6.5 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis

Os espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e do visível foram obtidos em espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453 Diode-Array. As amostras foram analisadas em dispersão aquosa utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os valores de absorvidade molares foram calculados pela lei de Lambert-Beer, através das medidas das absorvâncias das amostras em solução e em diversas concentrações.

## 3.4 Resultados e Discussão

### 3.4.1 Caracterização das MPSi-NP

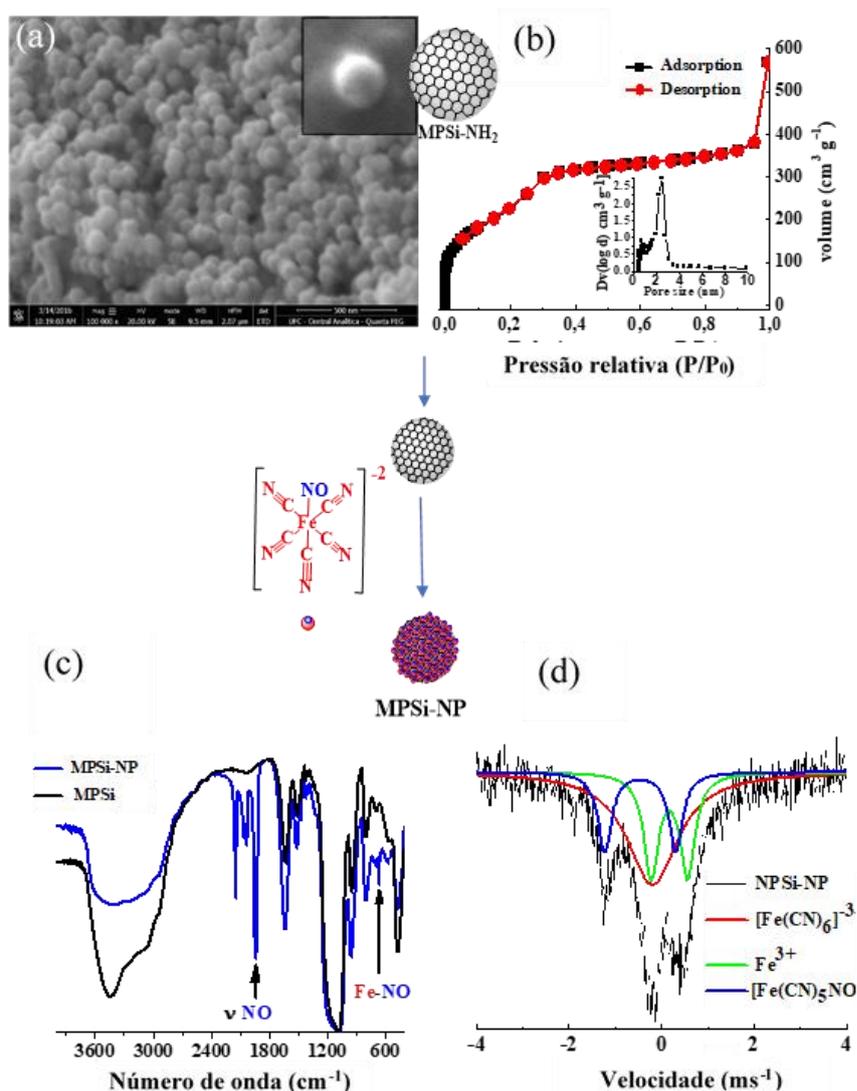
As micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das MPSi (Gráfico 24a) mostram um material com forma esférica, com distribuição de tamanho uniforme entre 80 e 110 nm. Pelos dados obtidos das isotermas de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> (Gráfico 24b) do MPSi o material exibe um tamanho de poros de 2,3 nm e uma área superficial de 678 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> de acordo com trabalho anterior[102].

Os espectros de IV para MPSi são mostrados no Gráfico 24c, no qual observa-se bandas entre 3750–3000 cm<sup>-1</sup> (*O-H e SiO-H*) e 1650 cm<sup>-1</sup> ( $\delta$  H-O-H) juntamente com outras bandas típicas associadas à sílica em 480 cm<sup>-1</sup> ( $\delta$  O-Si-O), 920 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{\beta}$  Si-O), 1200 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{as}$  Si-O-Si), e 1100 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{as}$  Si-O-Si) e com 1412 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_s$  Si-C)[103,104]. A adsorção de nitroprussiato causou mudanças nítidas no espectro, aparece uma banda forte em 1935 cm<sup>-1</sup> (Fe-NO  $\pi$ -backbonding) juntamente com as bandas em 2026 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$ CN de nitroprussiato), 2111 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$ CN de nitroprussiato), 2041 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$ CN de azul da Prússia), e 661 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$ Fe-NO)[105] (Gráfico 24c). Observa-se um deslocamento da banda  $\nu$ NO do nitroprussiato de sódio de 1939 cm<sup>-1</sup> para 1935 cm<sup>-1</sup> quando preso na estrutura da sílica.

A análise de Mössbauer mostrou três subespectros com centros de ferro distintos. Um desses espectros desconvoluídos, Gráfico 24d (linha azul), mostrou um deslocamento isomérico ( $\delta$ ) e um momento quadrupolo nuclear ( $\Delta$ ) de -0,09 e 1,53 mm/s (atribuído ao Nitroprussiato)[106]. Os outros dois núcleos exibiram  $\delta$  de 0,54 mm/s (verde) e 0,18 mm/s (linha vermelha), juntamente com  $\Delta$  de 0,79 mm/s (verde) e 0,00 (linha vermelha), respectivamente (Gráfico 24d) atribuído ao azul da Prússia decorrente da degradação do nitroprussiato durante o processo de adsorção[107]. No entanto, PB é altamente insolúvel,

considerado não tóxico, bem tolerado e difícil para o trato digestivo para absorver[108]. Desde 2003, o PB tem sido um medicamento aprovado pela FDA usado para o tratamento de contaminação interna com  $^{137}\text{Cs}$  e  $^{201}\text{Tl}$  radioativos, vendidos como Radiogardase. Assim, a presença desse composto no produto não representaria um problema para aplicações biológicas

**Gráfico 24.** Caracterizações de nanopartículas. MEV (a), adsorção-desorção de  $\text{N}_2$  para MPSi (b), espectro de FTIR para MPSi e MPSi-NP (c) e Mössbauer para MPSi-NP (d).



Fonte: O autor

O deslocamento observado no IR para a banda  $\text{NO}_\nu$  do nitroprussiato de  $1939 \text{ cm}^{-1}$  para  $1935 \text{ cm}^{-1}$  nas MPSi-NP pode estar relacionado a subtração de carga do átomo de ferro interno por meio de efeito de doação  $\pi$ -back, provavelmente decorrente da ligação de hidrogênio à extremidade N do grupo axial CN[109,110]. Isso levaria a uma distorção da geometria do ânion nitroprussiato[111] reduzindo o deslocamento em direção ao grupo NO,

aumentando o comprimento de banda F-N(Fe-NO)[110]. Esse evento ocorre provavelmente pela presença do grupo Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

### 3.4.2 Quantificação de Nitroprussiato, de NO e cianeto

A quantidade de nitroprussiato adsorvido nas MPSi foi de  $323,9 \pm 7,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Esse valor se mostra elevado quando comparado a outros trabalhos que usam SNP e outros sistemas de liberação de NO (Tabela 4).

**Tabela 4.** Comparação de diferentes sistemas de liberação de NO na literatura.

Material	NO total (mol g <sup>-1</sup> )	Método	Ref.
[Si(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (isn)Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (NO)] <sup>3+</sup>	$1.3 \times 10^{-4}$	Análise elementar de Ru	[65]
Si(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> [SNP]	$9.6 \times 10^{-7}$	Análise elementar de Fe	64[64 ]
MPSi-NP	$3.3 \times 10^{-4}$	UV-Vis	-
Alg300-DETA/NO	$6.5 \times 10^{-4}$	Quimioluminescência	40
MethylQA/NO	$3.0 \times 10^{-4}$	Quimioluminescência	[54]

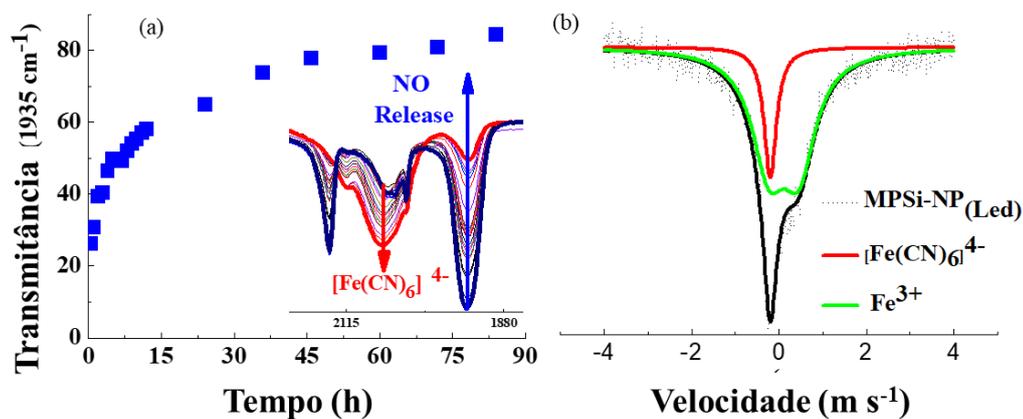
Fonte: O autor

A alta carga de encoramento é extremamente importante para a eficiência do material. Para a pastilha de KBr usando um LED azul (450-495 nm) e monitorando a banda em 1935 cm<sup>-1</sup> (Gráfico 25a) com base na redução de sua intensidade, observa-se a liberação de quase 80% do NO após 84 h de irradiação. Para o teste usando dispersão das MPSi-NP em solução PBS observa-se total liberação de NO após 96 horas de incubação, sendo que, alterações significativas foram observadas no espectro de Mössbauer (Gráfico 25b). Nesse espectro, são observados dois núcleos com um duplete em  $\delta = 0,54 \text{ mm / se } \Delta = 0,79 \text{ mm/s}$  e um singlete a  $\delta = 0,18 \text{ mm/s}$  característico de azul da Prússia.

O espectro de UV-Vis do sobrenadante mostrou uma banda espectroscópica característica de ferricianeto em 420 nm (Gráfico 26) e a quantificação de ferricianeto foi de  $25,3 \pm 0,6 \mu\text{mol}$  em 100 mg de MPSi-NP. Ao final das 96 horas observa-se o total de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> equivalente a  $335,2 \pm 3,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ .

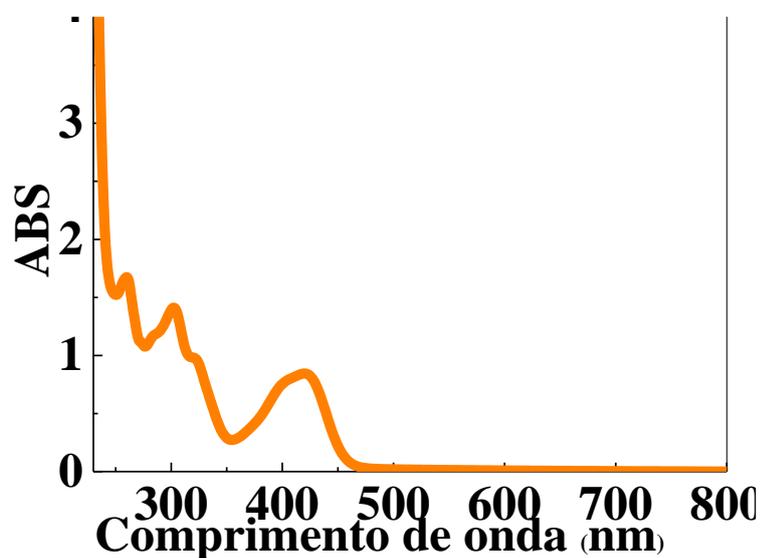
O espectro de UV-Vis do sobrenadante mostrou uma banda espectroscópica característica de ferricianeto em 420 nm (Gráfico 26) e a quantificação de ferricianeto foi de  $25,3 \pm 0,6 \mu\text{mol}$  em 100 mg de MPSi-NP. Ao final das 96 horas observa-se o total de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> equivalente a  $335,2 \pm 3,7 \mu\text{mol g}^{-1}$ .

**Gráfico 25.** Fotoliberação de NO usando LED azul. (a) Espectro de IV de MPSi-NP em pelotas de KBr irradiadas com led azul, (b) espectro de Mössbauer de NPSi-NP após irradiação (96 h) em dispersão aquosa.



Fonte: O autor

**Gráfico 26.** Espectro de UV-Vis do sobrenadante após 96 h de fotoliberação das MPSi-NP dispersas em PBS 7,2 usando um led azul.



Fonte: O autor

Em contrapartida a liberação de cianeto foi reduzida em 64%, indicando uma redução da toxicidade relacionada a cianeto (Tabela 4). Esses resultados sugerem a possibilidade de o uso das MPSi-NP em terapias envolvendo oxido nítrico, principalmente para tratamentos envolvendo hipertensão.

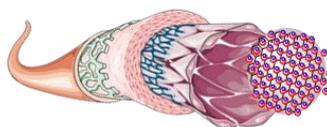
**Tabela 4.** Medição de cianeto livre produzido durante o tratamento fotoquímico e químico de MPSi–NP para liberação de NO a partir de 1 g de MPSi–NP.

Quantidade de nitroprussiato adsorvido	$323,9 \pm 7,6 \mu\text{mol g}^{-1}$
Quantidade de NO liberado	$335,2 \pm 3,7 \mu\text{mol g}^{-1}$
Redução de cianeto liberado	64,14 %

Fonte: O autor

### 3.5 Conclusão do Capítulo 2

Foram obtidos materiais com alta capacidade adsorviva de nitroprussiato o qual manteve-se ativo mesmo preso na estrutura da sílica. Resultados de espectroscopia na região do IV e Mössbauer indicam interação entre a matriz de sílica e o nitroprussiato. Ensaio de liberação de NO sob luz LED azul sugerem entrega completa do NO com menor liberação de cianeto. Esses resultados abrem possibilidades para novas estratégias de liberação de NO a partir do nitroprussiato de forma segura usando as nanoplateforma MPSi-NP.



### Ação Vasodilatadora

---

## 4 CAPITULO 3. ATIVIDADE VASODILATADORA E CITOTOXICIDADE DAS MPSi-NP

### 4.1 Introdução

Diferentemente de outras publicações sobre o uso de nitroprussiato em nanoplateformas, as MPSi-NP se mostraram capazes de reter em sua estrutura uma parcela significativa do cianeto. Por exemplo, o trabalho de Farooq et al.[64] indica a total liberação do nitroprussiato e seus subprodutos de ferro considerando a carreamento/entrega de nitroprussiato e não de NO. Já o trabalho de Hu et al.[65] apresenta total liberação de nitroprussiato até as duas primeiras horas. Isso mostra que as MPSi-NP são mais atrativas para tratamentos hipertensivos do que esses materiais. Indo além, abre novas possibilidades de atuação, além do uso recomendado para o nitroprussiato que são tratamento de infarto agudo do miocárdio, doença valvular mitral e aórtica, cardiomiopatia, e tratamento intra e pós-operatório em cirurgia cardíaca. O nitroprussiato também é utilizado para reduzir a pressão arterial (PA) durante o tratamento do AVC isquêmico agudo (AVCi) em pacientes submetidos à trombólise intravenosa (rtPA)[112].

Ao longo dos últimos anos o gás NO vem se destacando como um potencial vasodilatador pulmonar seletivo. Após a inalação, o NO difunde-se rapidamente pelos capilares alveolares no músculo liso subjacente do pulmão. Também foi constatado que nitroprussiato reduz hipertensão pulmonar de forma significativa de pacientes com disfunção ventricular esquerda crônica [113], além de estarem associados ao remodelamento cardíaca e melhora da função biventricular. Devido a essas propriedades o NO pode ser utilizado em tratamento para crianças com doença cardíaca congênita[114], embolia pulmonar aguda (PE)[115], doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)[116] e causa broncodilatação [117,118]. Devido a essas propriedades o NO pode ser utilizado em tratamento para crianças com doença cardíaca congênita[114], embolia pulmonar aguda (PE)[115], doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)[116] e causa broncodilatação[117,118]. Por isso, serão realizados teste de citotoxicidade e vasodilatação em aorta de ratos e de porquinho da Índia e também avaliar ação vasodilatadora em artéria pulmonar de porquinho da Índia.

## 4.2 Objetivos

### 4.2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a atividade vasodilatadora das MPSi-NP em aorta e artéria pulmonar e também avaliar a citotoxicidade do material.

### 4.2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar o potencial vasodilatador das MPSi-NP através do método de relaxação da aorta torácica em ratos Wistar machos e porquinhos da índia;
- Avaliar o potencial vasodilatador das MPSi-NP através do método de Relaxação das artérias pulmonares de porquinhos da índia;
- Avaliar a Ativação da Proteína Estimulada por Vasodilatador (VASP);
- Avaliar a citotoxicidade através de ensaios utilizando células VERO.

### 4.3 Metodologia

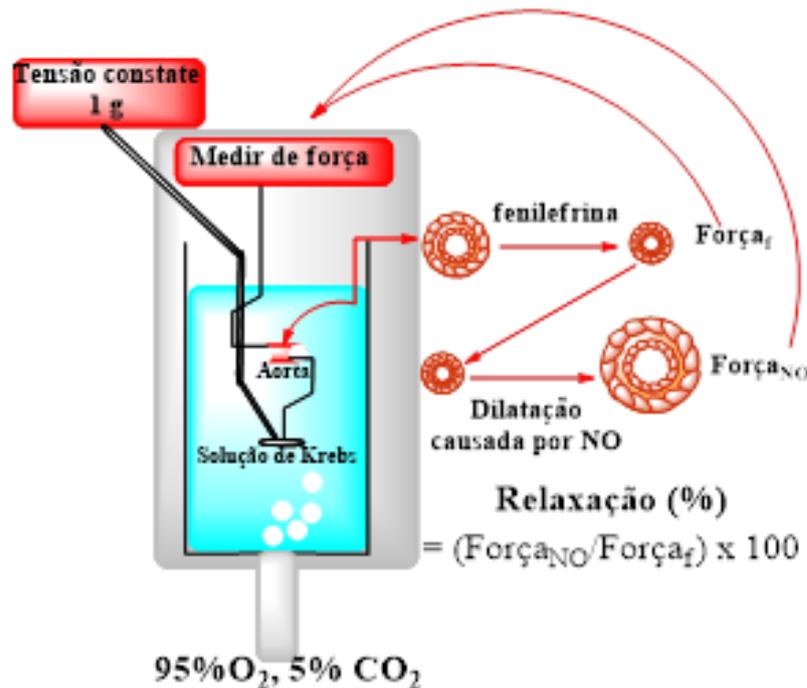
#### 4.3.1 Estudo das propriedades vasodilatadoras

Todas as análises para os estudos das propriedades vasodilatadoras das MPSi-NP e SNP foram realizadas no Instituto Superior de Ciências Biomédicas, da Universidade Estadual do Ceará.

##### 4.3.1.1 Estudos Funcionais Vasculares

Para este estudo utilizou-se aorta torácica de ratos de Wistar e artéria pulmonar de porquinhos-da-índia ( $n = 7$  animais; um vaso para cada animal). Os animais foram eutanasiados por overdose de tiopental de sódio ( $150 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) seguido de deslocamento cervical, conforme aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Ceará (UECE) sob o protocolo nº 2897836/15. As medidas de relaxamento foram realizadas em banho de órgão (Gráfico 27).

**Gráfico 27.** Esquema do banho de órgão e a medição da relaxação.



Fonte: O autor

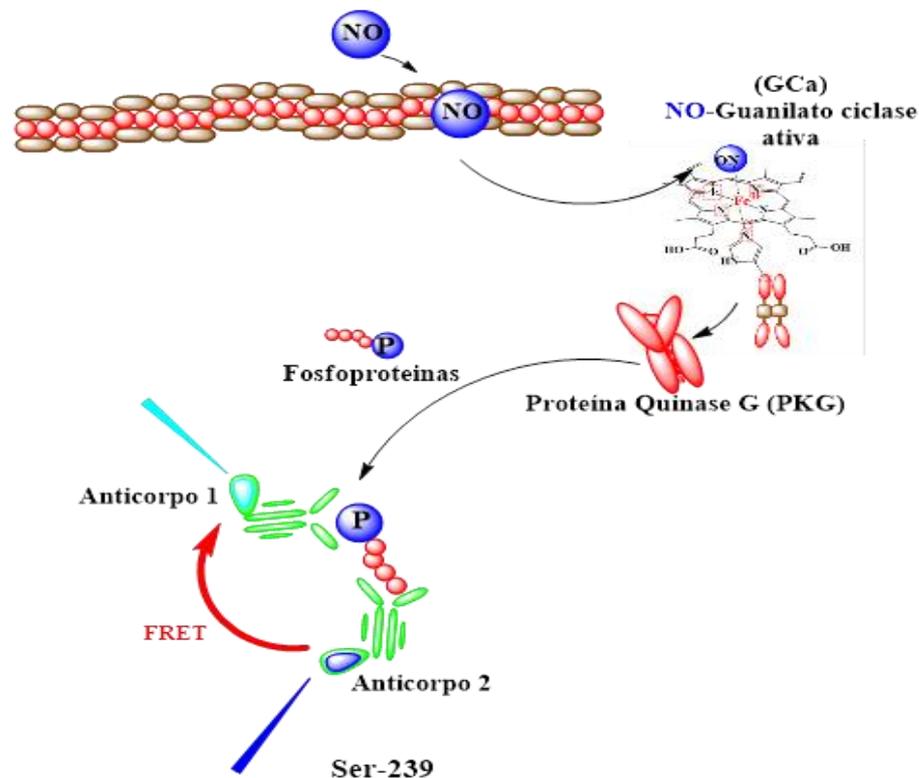
A aorta torácica ou artérias pulmonares foram cuidadosamente removidas e cortadas em anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento. O tecido adiposo perivascular foi removido do vaso enquanto era gaseado por uma mistura de 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub> e, em seguida, foi montado em um banho de órgão de 5 mL contendo solução de Krebs-Henselei a 37°C. Após o equilíbrio, os anéis foram contraídos com fenilefrina (PE,  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e colocados

sob uma tensão constante de 1 g durante todo o experimento. Em seguida, foram adicionadas quantidades crescentes de MPSi-NP e SNP ( $10^{10}$  a  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> nas aortas ou  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em artérias pulmonares). O efeito vasorelaxante foi medido como porcentagem da contração por fenilefrina.

#### 4.3.1.2 Ativação da proteína estimulada por vasodilatador (VASP)

O nível de fosforilação do resíduo Ser239 da VASP é um marcador útil para monitorar a ativação e sinalização da proteína quinase dependente de cGMP[119]. O VASP é um substrato importante para a proteína quinase G dependente de cGMP (PKG), enquanto o ensaio Phospho-VASP (Ser239) utiliza 2 anticorpos marcados: um com fluoróforo doador e outro com aceitador. O primeiro liga-se especificamente a região fosforada da proteína e o segundo a proteína independente do seu estado de fosforilação. A proteínas fosforadas permite a formação de um complexo que aproxima os dois anticorpos (fluoróforo doador e aceitador) gerando um sinal de Transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET). A intensidade é proporcional à concentração de proteína fosforada (Gráfico 28).

**Gráfico 28.** Princípio da análise VASP.



Fonte: (<https://www.cisbio.net/phospho-vasp-ser239-cellular-kit-40519>)

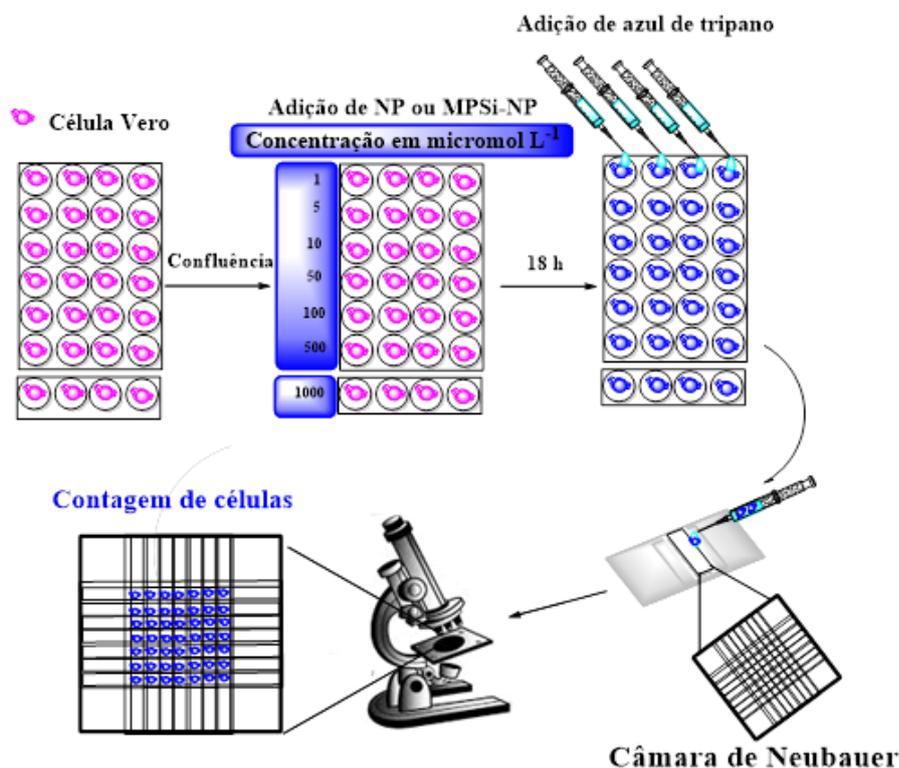
Foi avaliado o nível de fosforilação de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SNP livre ou  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  contidos nas MPSi-NP, para isso, utilizou-se anéis aórticos, os quais foram homogeneizados em PBS e enriquecido com Halt Protease Inhibitor Cocktail (1:100; Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA de TissueLyzer (Qiagen, Hilden, Alemanha). Na sequência, as amostras foram centrifugadas a  $17000 \text{ G}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min, e os sobrenadantes foram guardados para procedimentos posteriores.

As proteínas foram resolvidas usando eletroforese em gel SDS – PAGE. Alíquotas de  $50 \mu\text{g}$  de proteínas foram submetidas à SDS-PAGE (10% de acrilamida) e transferidas para uma membrana de PVDF a  $500 \text{ mA}$  durante a noite usando um aparelho Hoefer (Holliston, MA, EUA). Depois disso, a membrana foi imersa em uma solução de bloqueio de TBS-T (0,05% de Tween 20/0,1  $\text{mol L}^{-1}$  Tris/0,15  $\text{mol L}^{-1}$  NaCl, pH 7,5 mais 5% BSA). As membranas foram então incubadas durante a noite com o anticorpo primário para Ser239 da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), VASP total ou  $\beta$ -actina (1:5000, Sigma) como controle de carregamento interno. A membrana foi ainda incubada durante 1 h à temperatura ambiente com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina. A transferência foi desenvolvida usando um kit de quimiluminescência (CDP Star, Applied Biosystems) e lida usando um sistema de fotodocumentação Chemidoc XRS+ (Biorad, Hercules, CA, EUA).

#### **4.3.2 Ensaio de citotoxicidade**

Os ensaios de toxicidade foram realizados com células VERO, as quais foram cultivadas em placas de 24 poços contendo 1 mL por poço. O crescimento da cultura foi realizado a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$  em uma incubadora umidificada. O meio de cultura consiste em RPMI 1640 (pH 7,2-7,4, sigma R8758) suplementado com soro de bezerro recém-nascido (2%, NCS) e penicilina e estreptomicina ( $100 \mu\text{g/mL}$  de cada). Após, 80% das células atingirem a confluência foram tratadas com SNP e MPSi-NP a 1, 5, 10, 50, 100, 500 e  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  por 18 h. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de azul de tripano e, para esse fim, foram contadas 100 células por tratamento em uma câmara de Neubauer (Gráfico 29). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

**Gráfico 29.** Metodologia utilizada para avaliar a viabilidade celular contra diferentes concentrações de MPSi-NP e NP livre



Fonte: O autor

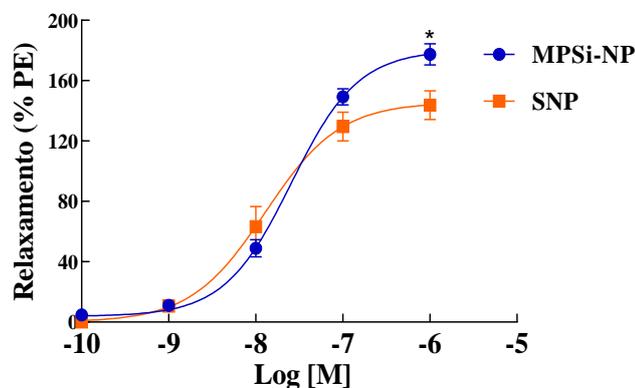
## 4.4 Resultados e Discussão

### 4.4.1 Função vascular

A ação das nanopartículas contendo nitroprussiato em tecidos foi avaliada através do relaxamento da aorta torácica de ratos Wistar e artérias pulmonares de porco-da-índia. As MPSi-NP promoveram relaxamento nos anéis aórticos de ratos Wistar (Gráfico 30) com potência semelhante a SNP livre, exibindo uma concentração necessária para induzir 50% de vasodilatação ( $EC_{50}$ ) de 26 nM [intervalo de confiança de 95% de 20–33 nM], enquanto o SNP livre foi de 13 nM [intervalo de confiança de 95% dos 7,9–21 nM]. No entanto, a vasodilatação máxima induzida por MPSi-NP ( $177,4 \pm 7,1\%$ ) foi superior ao relaxamento máximo induzido por NP livre ( $143,8 \pm 9,6\%$ ;  $P < 0,05$ , teste t de Student).

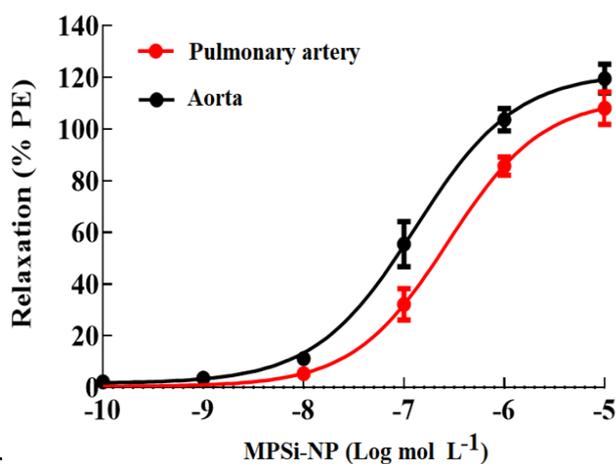
Um comparativo entre relaxamento nos anéis aórticos e artérias pulmonares de porquinhos-da-índia mostraram que as MPSi-NP possuem uma potência e eficácia semelhantes nesses tecidos (Gráfico 31). O  $EC_{50}$  para a vasodilatação induzida por MPSi-NP na artéria pulmonar foi de 193 nM [95% de confiança intervalo de 141 a 264 nM] e na aorta foi de 71,2 nM [95% intervalo de confiança de 48-105 nM].

**Gráfico 30.** Efeito da vasodilatação em aorta de ratos Wistar e comparação de MPSi-NP (círculo azul) e nitroprussiato de sódio livre (SNP, quadrado laranja) nos anéis aórticos pré-contratados com fenilefrina. \*  $p < 0,05$  vs SNP na mesma concentração



Fonte: O autor

**Gráfico 31.** Efeito vasorelaxante do MPSi-NP na fenilefrina aorta pré-contráida ou artérias pulmonares retiradas de porquinhos-da-índia. Não foram encontradas diferenças estatísticas.



Fonte: O autor

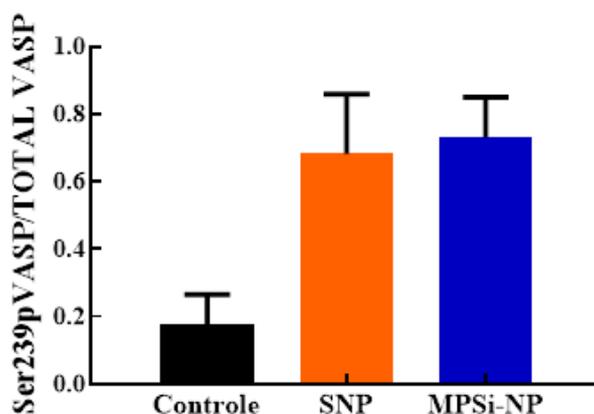
Esses resultados, juntamente com os estudos químicos, indicam uma liberação eficiente de NO, permitindo o uso de SNP ancorado com menor emissão de cianeto. Observa-se similaridade na potência e eficácia, tanto para SNP livre e para SNP adsorvido quanto para diferentes tecidos (aorta e artéria), indicando o potencial das MPSi-NP em tratamentos de emergência hipertensivos, angina, hipertensão pulmonar[120].

#### 4.4.2 Ativação da Proteína Estimulada por Vasodilatador (VASP)

A capacidade das MPSi-NP de ativar a proteína VASP por fosforilação do resíduo Ser239 causada por uma proteína quinase dependente de cGMP também foi semelhante ao

efeito do SNP livre. O nível de fosforilação desta proteína foi aumentado 4 vezes por ambos os compostos (Gráfico 32). A regulação dessa atividade biológica pode ser usada para prevenir trombose de stent, derrames e ataques cardíacos em pacientes com risco desses problemas.

**Gráfico 32.** Efeito de 1  $\mu\text{M}$  SNP ou MPSi-NP em comparação com adição isovolumétrica de veículo (controle) apenas ao nível de fosforilação do resíduo serina 239 da fosfoproteína estimulada por vasodilatador de proteínas (VASP), um substrato de cGMP ativado por cGMP proteína quinase (PKG). \*  $p < 0,05$  vs controle, teste t de Student.



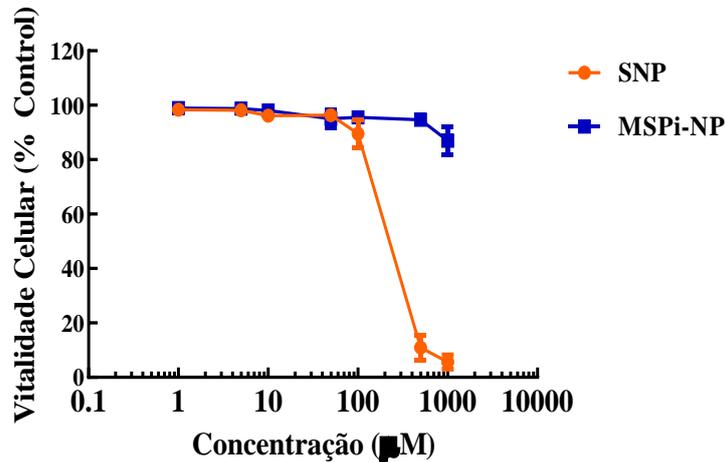
Fonte: O autor

#### 4.4.3 Citotoxicidade

Apesar das medidas de liberação de NO e cianeto indicarem diminuição da liberação de cianeto pelo MPSi-NP em comparação com o SNP livre, apenas essa informação não garante a segurança biológica. Para isso, um teste de citotoxicidade foi realizado utilizando células epiteliais renais (Células Vero). Neste ensaio, SNP e MPSi-NP foram utilizados a partir de 1 até 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O  $\text{LC}_{50}$  calculado (dose letal de 50%) para SNP foi 228,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (147,2-354,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Gráfico 33).

Para as MPSi-NP não foi possível estimar o  $\text{LC}_{50}$  usando concentrações de até 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (~ 3 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Os efeitos da vasodilatação ocorreram a faixa nanomolar em grande semelhança entre MPSi-NP e SNP, mas suas citotoxicidades foram muito distintas. Apesar de não ter sido possível medir o  $\text{LC}_{50}$  para o MPSi-NP consegue-se garantir que ele seja pelo menos 5 vezes menor que o SNP livre. A diminuição máxima na viabilidade celular induzida para as MPSi-NP foi de apenas  $13,1 \pm 3,2\%$ . Este resultado pode estar relacionado a redução da liberação de cianeto. Isso é bastante animador, visto que materiais semelhantes apresentaram redução de 60% de viabilidade celular de células epiteliais da córnea humana [64].

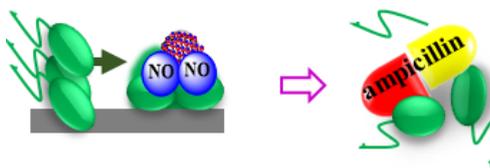
**Gráfico 33.** Efeitos de SNP ou MPSi-NP (1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ) na viabilidade das células VERO. As células foram cultivadas em 24 poços placas até 80% de confluência foi alcançada. Os compostos eram incubados por 18 h, e os experimentos foram repetidos três vezes.



Fonte: O autor

#### 4.5 Conclusão do Capítulo 3

A ação das MPSi-NP sobre aorta e artéria pulmonar do nitroprussiato de sódio foi mantido em comparação a concentração equimolar encapsulado sobre a estrutura da sílica. Os resultados mostraram que a  $EC_{50}$  das MPSi-NP para a vasodilatação foi muito próxima a do exibido pelo nitroprussiato, embora estando fortemente preso a estrutura da sílica. Porém, e surpreendentemente, a citotoxicidade para as MPSi-SNP em células de mamíferos foi muito diferente, houve uma redução considerável na citotoxicidade em torno de 5 vezes. O efeito vasodilatador das MPSi-NP sobre aorta e artéria pulmonar demonstra seu potencial para tratamento pulmonar e sistêmico hipertensivo, diminuindo a pré-carga cardíaca e pressão arterial pulmonar.



### Ação antibacteriana

## 5 CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DAS MPSI-NP

### 5.1 Introdução

O NO atua no sistema imune e na inflamação, sendo que o NO endógeno tem efeitos pró e anti-inflamatórios, atuando na inibição de adesão de neutrófilos, na atividade da cicloxigenase, na formação de citocinas e reabsorção óssea. Em condições homeostáticas, o NO atua como mensageiro intracelular e um fator citoprotetor (antioxidante), bloqueia a exocitose de mediadores inflamatórios por células endoteliais prevenindo inflamações dos vasos sanguíneos. Sob estímulos inflamatórios, ocorre o aumento significativo da produção de NO em variados tipos de células. Esses efeitos têm consequência na formação de trióxido de dinitrogênio e peroxinitrito em locais de formação simultânea de superóxido, como ocorre em fagócitos[121,122]. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio derivadas do NO são essências para proteção contra vários patógenos intracelular, tais como vírus, bactérias, fungos e protozoários[123]. Além disso, o NO pode levar à morte diferentes espécies de parasitas [41,43,53–55]. Este fenômeno é bastante interessante para tratamentos e aplicações antimicrobianas[124,125].

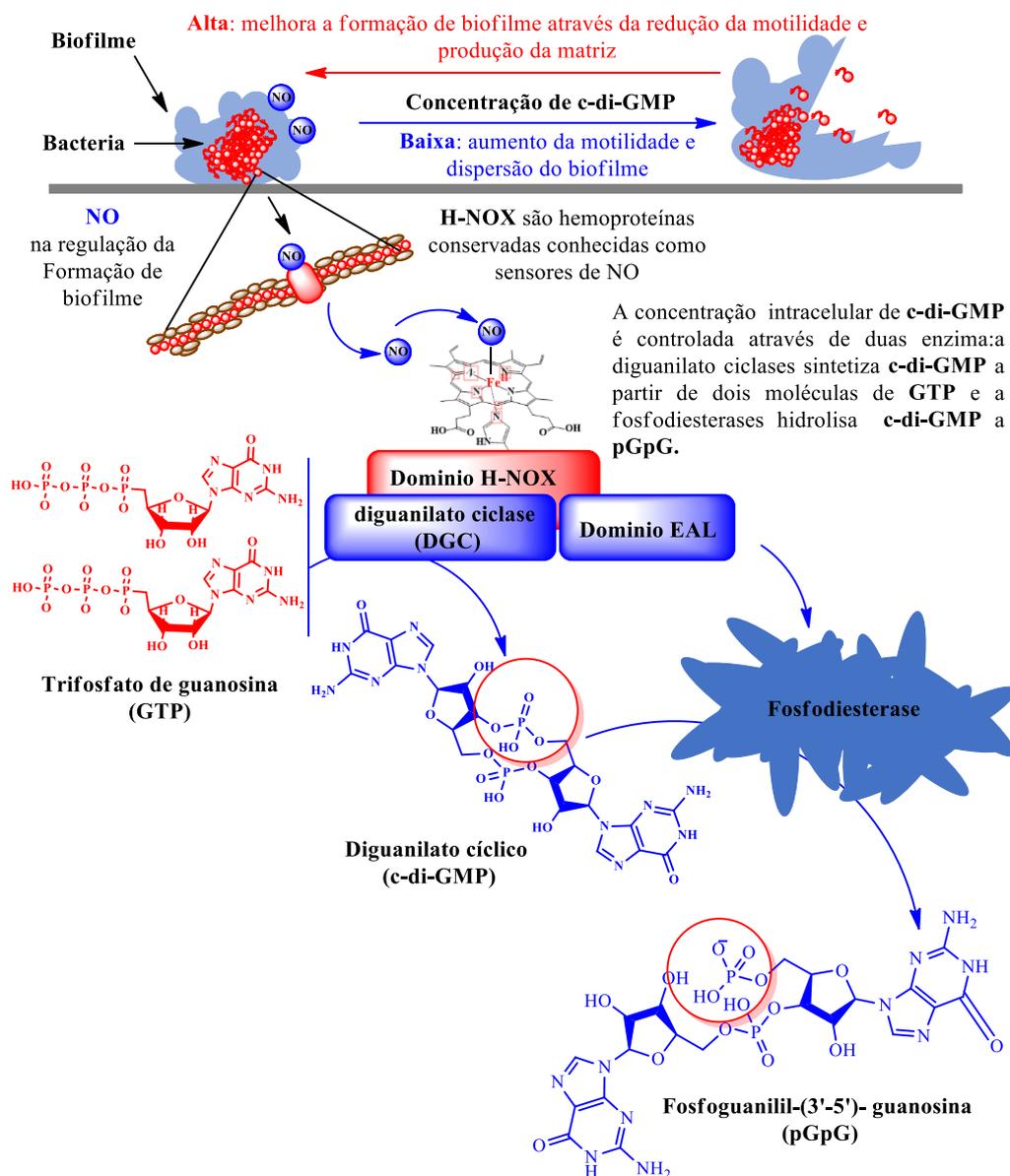
Infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (MRA) estão entre as principais causas de morte para pessoas de todas as idades. Estima-se que em 2019, 4,95 milhões de pessoas morreram de doenças, nas quais a MRA bacteriana desempenhou um papel importante. Dessas, 1,27 milhão de mortes foram resultado direto da MRA, o que significa que infecções resistentes a medicamentos mataram mais pessoas do que HIV/AIDS (864.000 mortes) ou malária (643.000 mortes) [126]. Publicação recente estimou que até 10 milhões de pessoas podem morrer anualmente da AMR até 2050 [127]. Uma das principais mecanismo de resistência das bactérias é a formação do biofilme.

Os biofilmes bacterianos são responsáveis pela falha de muitos dispositivos médicos e estão associados a muitas complicações infecciosas e não infecciosas[128]. Por exemplo, a chance de desenvolver infecções associadas ao cateter uretral aumenta de 3 a 7% a cada dia de uso[129]. Isso não ocorre somente para o cateter uretral, para a derivação ventricular externa cerca 9-20% dos pacientes desenvolvem uma infecção associada ao cateter[130]. Para sistemas intravasculares, as proteínas plasmáticas que se ligam à superfície dos cateteres intravasculares podem promover a adesão bacteriana, levando ao risco de complicações locais e sistêmicas, como infecções sanguíneas relacionadas ao cateter. As incidências de nos Estados

Unidos somam mais de 250.000 casos/ano com uma mortalidade atribuível de até 35% e um gasto anual com saúde de aproximadamente US\$ 2,3 bilhões[131].

O NO atua na dispersão celular de biofilme tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Uma das hipóteses moleculares de sua atuação é pela interação com o domínio H-NOX, o qual liga-se ao NO e controla a síntese enzimática ou a hidrólise do c-di-GMP, fornecendo uma explicação molecular para a dispersão do biofilme mediada pelo NO[132] (Gráfico 34).

**Gráfico 34.** Representação da atuação do óxido nítrico na produção de biofilmes

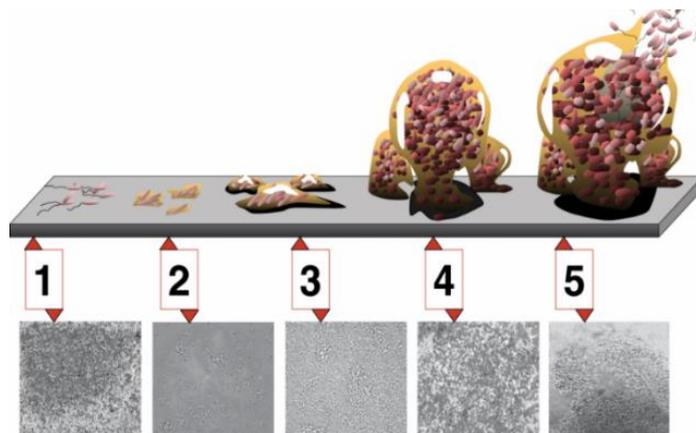


Fonte: O autor

Biofilmes microbianos são comunidades de células aderidas a uma superfície revestida por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas. As substâncias são produzidas pelos próprios microrganismos e são responsáveis por aumentar a chance de sobrevivência em um determinado meio. O biofilme protege a comunidade contra agentes antimicrobianos e a resposta imune do hospedeiro. O processo de formação de biofilme é dividido em 5 estágios (Gráfico 35)[133]:

- 1- Adesão das bactérias planctônicas à uma superfície, que ocorre de forma aleatória. É um processo reversível e mantido por interações físico-químicas não específicas;
- 2- Adesão irreversível, em que as bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme;
- 3- Formação de microcolônias;
- 4- Desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro;
- 5- Dispersão, que ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção, e consiste no descolamento do biofilme maduro em forma de agregados celulares ou células planctônicas. Depois de desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes.

**Gráfico 35.** Estágios da formação patogênica de biofilme de bactérias planctônicas: [1] fixação inicial, [2] adesão irreversível, [3] formação de microcolônias, [4] Maturação e diferenciação e [5] Dispersão.



Fonte: adaptada de Monroe et al.

Há diversos estudos envolvendo a síntese e aplicação de nanopartículas de sílica mesoporosa modificadas com NONOate e sua atuação antimicrobica, porém, a produção desses materiais requer alta pressão de NO gasoso [41,43,53–55], o que encarece o processo e

inviabiliza a comercialização e também pode levar a formação de N-nitrosamina, as quais são em sua maioria neoplasiaígenas[56,57]. As MPSi-NP, apresentaram uma efetiva liberação de NO e menores teor de cianeto e redução da citotoxicidade em relação ao nitroprussiato livre. Estes resultados sugerem a possibilidade do uso das MPSi-NP em tratamento tópico de infecções causadas por bactérias, tais como, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, comumente associados com infecções de feridas, queimaduras e nosocomiais [134,135].

*Staphylococcus aureus* é apontado como causa de 76% das infecções de pele e tecido[136], o que ocasiona 10 milhões de visitas hospitalares por ano[137]. *S. aureus* é associado a dermatite atópica (DA)[138] sendo detectado em cerca de 70% dos pacientes com DA com pele lesionada e em 39% dos pacientes com DA com pele não lesionada[139]. Porém, é raramente detectado em pele saudável[140]. *Staphylococcus epidermidis*, por muito tempo foi considerado inofensivo, no entanto, hoje é considerado um dos principais patógenos associados a infecções hospitalares, principalmente entre os imunocomprometidos, pacientes imunossuprimidos, internados e gravemente doentes[141], causando infecções oportunistas, devido a formação de biofilmes[142].

Vários estudos indicam que NO atua também na dispersão/redução celular de biofilme em bactérias[143–147], possibilitando seu uso em conjunto com outros agentes bactericidas e os potencializando[145]. Por isso, neste trabalho, pretende-se avaliar a atuação das MPSi-NP na dispersão de biofilme de cepas de *Staphylococcus* sensíveis a meticilina (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228) e cepas resistentes a meticilina (*S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984) e atuação combinada com antibiótico padrões, ampicilina e tetraciclina.

## 5.2 Objetivos

### 5.2.1 *Objetivos Geral*

Estudar a atividade antibacteriana das MPSi-NP e avaliar sua atividade combinada com antibióticos padrões.

### 5.2.2 *Objetivos específicos*

- Estudar a liberação de NO das MPSi-NP sob luz ambiente e temperatura corporal (37°C);
- Estudar a ação bactericida das MPSi-NP e identificar se há Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) sobre de cepas de *Staphylococcus* sensíveis a metilina (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228) e cepas resistentes a metilina (*S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984);
- Avaliar o efeito das MPSi-NP sobre a atividade metabólica e o número de células viáveis na dispersão de biofilme de cepas de *Staphylococcus* sensíveis a metilina (*S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228) e cepas resistentes a metilina (*S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984);
- Avaliar o efeito da combinação das MPSi-NP com os antibióticos ampicilina ( $\beta$ -lactâmico) e tetraciclina (amplo espectro) sobre cepas resistentes a metilina (*S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984).

## 5.3 Metodologia

### 5.3.1 Cinética de dialise de NO e monitoramento de cianeto liberado

O estudo de liberação de NO e cianeto das MPSi-NP foi realizado via dialise. Para isso, utilizou-se 11 mL (aproximadamente 11,3 g) de uma dispersão de concentração 0.5 % (m/m) de MPSi-NP em solução tampão PBS pH 7,2 (28 mmol L<sup>-1</sup>) a qual foi transferida para uma bolsa de dialise (membrana de celulose, limite de MW 11261, Sigma – Aldrich, área total de contato de 369,6 cm<sup>2</sup>).

A bolsa de diálise foi imersa em 200 mL de água deionizada e mantida sob agitação branda e temperatura constante de 37 °C. Alíquotas foram coletadas nos seguintes intervalos de tempo: 0, 15 e 30 min, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h. Para todas as alíquotas foi adicionado 40 µmL do reagente de Griess e posteriormente analisadas por espectrofotometria na região do UV-Vis, no comprimento de onda de máxima absorvidade molar (543 nm). Para o monitoramento de cianeto repetiu-se o procedimento anterior, porém, agora alíquotas de 2 mL foram coletadas nos tempos de 0 h, 3 h, 9 h e 24 h. O cianeto liberado foi avaliado semiquantitativamente usando kit eXact® Cyanide- Complete Visual Kit.

### 5.3.2 Teste da ação bactericida das MPSi-NP

Estes testes foram realizados no Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS)/UFC.

#### 5.3.2.1 Microrganismo

Para estes estudos foram utilizadas cepas padrão que integram o acervo da American Type Culture Collection (ATCC). As cepas estão apresentadas na Tabela 5 com o nome da espécie, seguida de um código de identificação e características e/ou uso.

**Tabela 5.** Bactérias padrão para estudos de suscetibilidade.

Cepa	Origem	Característica/uso
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Seattle (USA) 1945	Sensível a meticilina/ Exame de produtos lácteos
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Não documentada	Produz polissacarídeos de adesão, genoma completo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	Não documentada	Resistente a meticilina (MRSA) e suscetibilidade heterogênia à vancomicina
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	Sepse de cateter, Tennessee (USA)	Produz polissacarídeos de adesão, genoma completo

Fonte: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

### 5.3.2.2 Condições da cultura

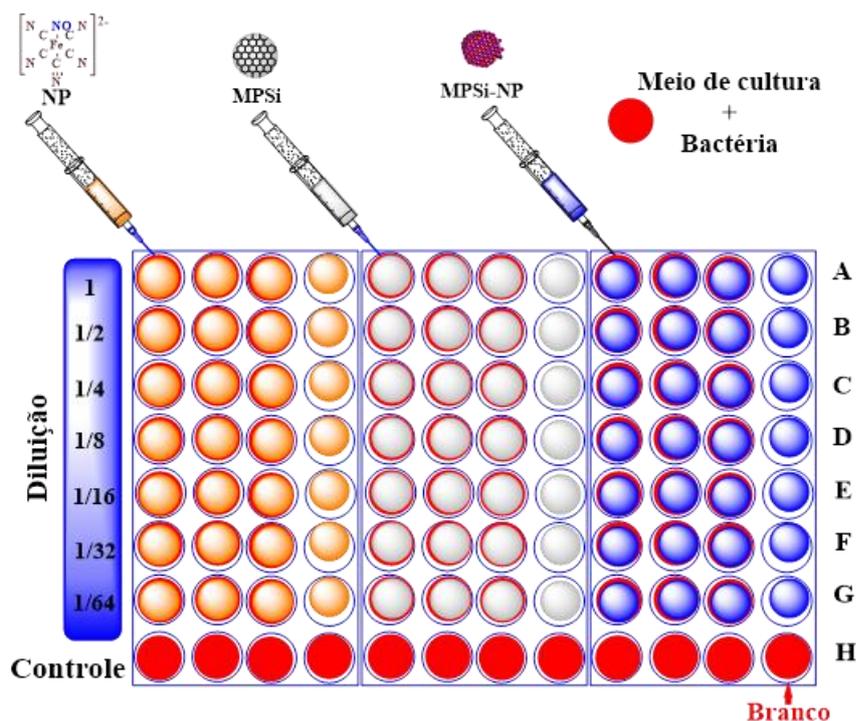
Para este estudo utilizou-se uma adaptação com modificações da metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, (2015). As bactérias foram armazenadas em uma solução de meio de Soja Tríptica Caldo (TSB) e glicerol 20% na temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a incubação, estriou-se a solução de armazenamento em placas de Petri contendo meio Soja Tríptica Ágar (TSA) que foram mantidas a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Em cada placa foram removidas 5 colônias e inoculadas em 5 mL de meio TSB e incubadas sobre as mesmas condições por 24 h. As culturas formadas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a  $8.603\text{ G}$  por 5 min, descartou-se o sobrenadante e as bactérias foram redispersas em novo meio TSB (10 mL). Ao final, a concentração celular da suspensão bacteriana foi ajustada a  $2 \times 10^6$  de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) utilizando uma curva de calibração de turbidimetria (620 nm) de cada bactéria através de um espectrofotômetro (Amersham Biosciences).

### 5.3.2.3 Incubação em placas de 96 poços

Esta etapa inicial foi utilizada tanto para determinar o MIC, CBM quanto quantificação do biofilme e contagem de células viáveis. As atividades antimicrobianas foram avaliadas de acordo com o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato seguindo as normas da CLSI. Os poços da linha A foram preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de TSB contendo SNP, MPSi e MPSi-NP, Em seguida, realizou-se a diluição seriada na base dois para obtenção de diferentes concentrações, que variaram entre 10.00  $\text{mg mL}^{-1}$  a  $1.56 \times 10^{-1}\text{ mg mL}^{-1}$  para as nanopartículas e 1.00  $\text{mg mL}^{-1}$  a  $1.56 \times 10^{-2}\text{ mg mL}^{-1}$  (Gráfico 36).

Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana já previamente ajustada na concentração de  $2 \times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}$  foi adicionada na placa, com conseqüente diminuição da suspensão, ficando as concentrações entre 5.00 e  $7.81 \times 10^{-2}\text{ mg mL}^{-1}$  para as nanopartículas e 0.50 e  $7.81 \times 10^{-3}\text{ mg mL}^{-1}$  para o nitroprussiato livre. NO final a suspensão bacteriana ficou em  $1 \times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}$  e o volume final de 200  $\mu\text{L}$ . As placas foram incubadas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em paralelo, foi determinado o CIM para os fármacos ampicilina e tetraciclina, utilizando faixa de 0.04 a 1.000  $\text{mg mL}^{-1}$  e 0.39 a 100  $\text{mg mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Gráfico 36.** Diluição seriada para as medidas de biomassa



Fonte: O autor

#### 5.3.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM).

Para a determinação do CBM, de cada poço que não foi observado turbidez foi removido 10  $\mu\text{L}$  de cada poço e inoculado em uma placa de Petri contendo TSA. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C.

#### 5.3.2.5 Contagem de células viáveis dos biofilmes

Após a formação dos biofilmes, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, para remoção das células fracamente aderidas. Posteriormente, cada poço foi preenchido com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril e submetido ao banho ultrassônico (Cristófoli/EQM-CF) por 8 minutos para o desprendimento das células incrustadas nos biofilmes. Em seguida, uma diluição decimal seriada das amostras em suspensão foram plaqueadas em meio TSA e incubadas sobre as mesmas condições acima citadas, mas por um período de 24 horas. O número de Unidades Formadoras de Colônias foi determinado e os resultados expressos em termos de  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL.

### 5.3.2.6 Quantificação da biomassa total

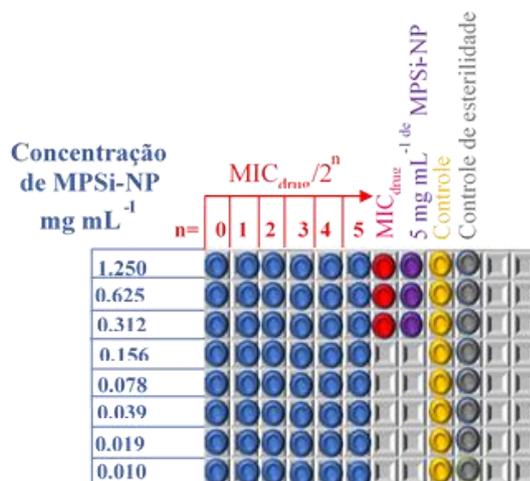
A biomassa do biofilme foi quantificada usando a metodologia do corante cristal violeta (CV) [42]. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com água destilada estéril para remover células fracamente aderidas e os poços foram cheios com 200  $\mu\text{L}$  de metanol a 95% durante 5 min. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de 1% de CV foram adicionados aos poços e incubados por 5 min a 25 ° C. O excesso de corante foi removido. O corante no biofilme foi dissolvido com solução de ácido acético a 33%. A mancha eluída de cada poço foi quantificada medindo a densidade óptica a 590 nm (OD590), usando um leitor de microplaca (SpectraMaxVR I3, Molecular Devices)

### 5.3.2.7 Avaliação do efeito das MPSi-NP associada aos antibióticos padrão

Para a avaliação do efeito das MPSi-NP associadas com antibióticos foi utilizada a metodologia checkerboard[148,149]. Foram preparadas duas combinações: nanopartículas x TETRA (tetraciclina) e material x AMP (ampicilina). Os testes foram feitos contra as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. Inicialmente foram preparadas concentrações de 4 vezes à CIM dos fármacos[150] e 5 mg mL<sup>-1</sup> para as MPSi-NP. Para os testes foi utilizado microplacas de 96 poços, de poliestireno e fundo plano. Inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  da dispensação das nanopartículas foram adicionadas nos poços de A1 a A6 e diluídos na base 2 horizontalmente (sentido A a H) cada poço ficou com um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . Em outras placas, 150  $\mu\text{L}$  dos fármacos foram adicionados nos poços A ao H e posteriormente diluídos na base 2 horizontalmente (no sentido do poço 1 ao 6). Logo depois, 50  $\mu\text{L}$  das soluções do fármaco foi adicionado nas placas contendo as nanopartículas. Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana já previamente ajustada na concentração de  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> foi adicionado a todos os poços, ficando a concentração na  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e o volume final de 200  $\mu\text{L}$  e concentração final de umas das substâncias usadas foram CIM, 1/2 da CIM, 1/4 da CIM, 1/8 da CIM, 1/16 da CIM e 1/32 da CIM (Gráfico 37).

Ao final, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Na coluna 7 foi adicionado o fármaco na concentração do MIC, na coluna 8 foi adicionado as nanopartículas na concentração de MIC, as colunas 9 e 10 são do controle de esterilidade do meio, respectivamente. A atividade antibacteriana foi avaliada via ensaio de resazurina, para isso, adicionou-se em cada poço 20  $\mu\text{L}$  da solução de resazurina e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. A redução da resazurina e formação de resorufin pela atividade metabólica foi medida por fotometria ótica de placa (SpectraMax i3) com  $\lambda_{\text{excitação}}$  de 530 nm e  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 590 nm.

**Gráfico 37.** Distribuição da placa para o teste de ação combina entre as MPSi-NP e os antibióticos ampicilina e tetraciclina



Fonte: O autor

### 5.3.3 Ensaio de atividade hemolítica para as MPSi-NP

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia previamente publicada[150]. Amostras de sangue humano ( $O^+$ ) recentemente coletadas foram misturadas a uma solução de heparina. A suspensão de glóbulos vermelhos foi lavada 3 vezes com NaCl 9% e redisperso. As análises foram realizadas em placas de 96 poços, no qual foi realizada a diluição seriadas na base 2 para as MPSi\* de 5 a 0.078 mg mL<sup>-1</sup> e a estas foram adicionados de glóbulos vermelhos na concentração de 3%, ao final, as placas foram incubas por 12 horas. Para o controle positivo foi utilizado uma solução de 1% dodecil sulfato de sódio (SDS) e para controle negativo foram utilizadas duas soluções, um de NaCl 9% e outra 4% DMSO. Depois, as suspensões foram centrifugadas e o sobrenadante coletado com medição da densidade ótica a 450 nm (DO450). A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a equação 1:

Porcentagem de hemólise

$$= \left( \frac{\text{DO450 das MPSi - NP} - \text{DO450 of 9\% NaCl}}{\text{DO450 do 1\% SDS} - \text{DO450 do 9\% NaCl}} \right) \times 100 \quad \text{equação 1}$$

### 5.3.4 Linhas de células e condições de cultura

Neste experimento foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos de mama humana (NCTC-CL929) da ATCC® (American Type Culture Collection, EUA) adquiridas do Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ). As células foram mantidas em frascos T-25 contendo meio

DMEM, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% L-glutamina, 100 U mL<sup>-1</sup> penicilina e 100 µg mL<sup>-1</sup> estreptomicina, a 37 ° C, sob uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura era trocado rotineiramente a cada três dias ou quando atingia 90% de confluência; Em seguida, as células foram tratadas com tripsina (0,025% de tripsina / 0,1% de EDTA) e subcultivadas e usadas para ensaios de viabilidade. Em todos os ensaios, as células foram usadas entre os números de passagem 3 e 10 [151].

### 5.3.5 Viabilidade celular

Para determinar o efeito do MPSi-NP, o Reagente em Pó Aquoso CellTiter 96 MTT (Promega) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Após a tripsinização com TE, as células ( $1,0 \times 10^4$  por 200 µL por poço) foram semeadas em placas de 96 poços de fundo plano em DMEM contendo 10% de FBS e incubadas durante a noite. Em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de cultura fresco (DMEM) em diferentes concentrações de MPSi-NP (5,00 mg mL<sup>-1</sup> a  $7,81 \times 10^{-2}$  mg mL<sup>-1</sup>). Os ensaios de viabilidade celular usando sal MTS foram realizados dentro de 48 h para todas as linhas celulares. Portanto, todo o meio de cultura foi removido e substituído por meio não suplementado (DMEM) contendo o sal de tetrazólio de MTT. A densidade óptica foi medida a 490 nm em um leitor de microplaca (SpectraMax i3). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, para três experimentos independentes, onde a viabilidade celular foi calculada usando a equação 2.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left( \frac{(\text{Abs; average OD at 490 nm (MPSi-NP)})}{(\text{Abs; average OD at 490 nm (cell control)})} \right) \times 100 \text{ equação 2}$$

## 5.4 Resultados e Discussão

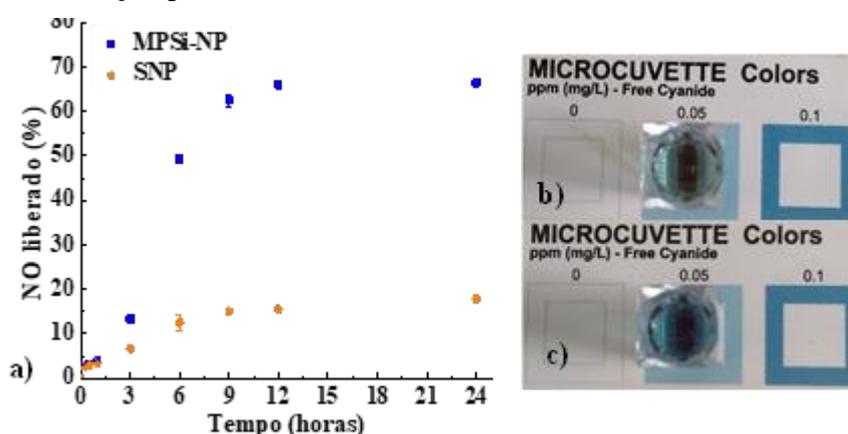
### 5.4.1. Cinética de liberação de NO e quantificação do cianeto das MPSi-NP

O Gráfico 38a apresenta a porcentagem de NO liberado durante o intervalo de 24 h. Os valores de cianeto liberado ficaram abaixo de 0.1 mg L<sup>-1</sup> tanto para o nitroprussiato livre quanto encapsulado. Apesar das MPSi-NP apresentarem maior taxa de liberação de óxido nítrico, aproximadamente 3 vezes maior, os valores para cianeto são próximos ao nitroprussiato livre, principalmente nas primeiras 9 h de liberação (Gráfico 38), reforçando a hipótese da redução da toxicidade do nitroprussiato pela estrutura da sílica.

Para o cianeto total, a coloração da cubeta indica uma concentração na faixa de 0,1 mg L<sup>-1</sup> para as MPSi-NP (Gráfico 39b) e 0,05 mg L<sup>-1</sup> (Gráfico 39c) para o SNP. Esse valor sugere que para as 24 h, foi liberado no total 77.24 µmol de cianeto por grama (µmol g<sup>-1</sup>) para SNP e 15.48 µmol g<sup>-1</sup> para MPSi-NP. porém, surpreendentemente, as MPSi-NP liberaram 65.23

% de NO em contraste com apenas 17.77% do SNP durante as primeiras 24 horas, além disso as MPSi-NP liberaram  $7.0 \mu\text{mol g}^{-1}$  (grama de MPSi-NP) de cianeto contra  $69.9 \mu\text{mol g}^{-1}$  do nitroprussiato. Os valores da razão  $\text{NO}/\text{CN}^-$  liberados indicam que as MPSi-NP liberam mais NO e retêm o cianeto para o período de 24 h (Tabela 6). Indicando que as MPSi-NP foram capaz de liberar NO e transpassar a membrana.

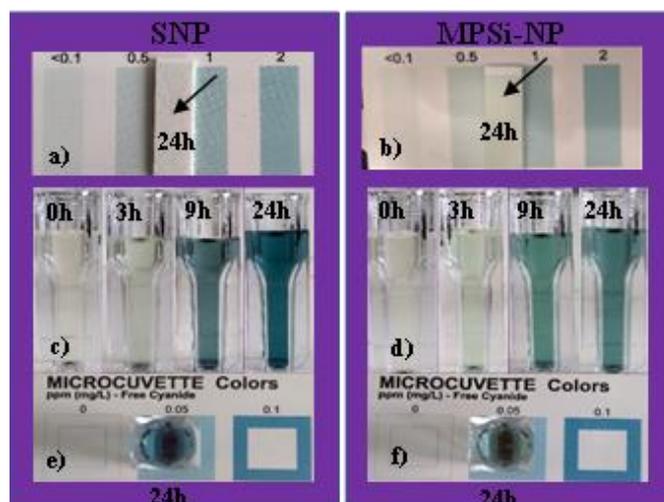
**Gráfico 38.** a. Cinética de liberação de NO por 1 g de MPSi-NP ou SNP, foto da coloração da cubeta indicativa da concentração de cianeto para a dispersão de b) SNP, c) MPSi-NP e d) faixa indicativa de concentração para o kit.



Fonte: O autor

A baixa taxa de liberação de NO pela solução de SNP já foi observado em trabalhos anteriores, onde soluções expostas a luz fluorescentes liberaram apenas 11.7 % em 24 h e 100% após 72 h[152] além disso, para o SNP a literatura não reporta degradação quando utiliza-se luz vermelho[153]. As MPSi-NP, por sua vez, apresentaram uma taxa de liberação maior do que a observado para o nitroprussiato livre (SNP), isso se deve provavelmente, a presença de  $\text{H}^+$  na estrutura da sílica, remanescente da extração do surfactante no processo de síntese. A liberação de NO em pHs ácidos favorece a entrega rápida de óxido nítrico[154], indicando que além de ser um meio carreador, de reduzir a toxicidade as MPSi-NP também atuam como facilitadoras no processo de liberação de NO do nitroprussiato. Esses resultados indicam que as MPSi-NP são materiais capaz de liberar NO através de fotoliberação induzido por luz visível do ambiente, fazendo-se promissor para tratamentos mais acessíveis, pois a maioria dos liberadores inorgânicos de NO requerem uso de LED.

**Gráfico 39.** Resultados semiquantitativos para a liberação de cianeto, fita indicando concentrações menores que  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  após 24 horas de dialise para a. MPSi-NP e b. SNP; coloração das cubetas para as c. MPSi-NP e c. SNP ou d. MPSi-NP para 0 h, 3 h, 9 h e 24 h de e dialise e vista superior para as cubetas com indicativos da concentração de cianeto para e. MPSi-NP e f. SNP.



Fonte: O autor

**Tabela 6.** Óxido nítrico e cianeto liberado por grama de SNP e MPSi-NP após 24 h.

	NO total* ( $\mu\text{mol}$ )	NO liberado ( $\mu\text{mol}$ )	% de NO liberado	Cianeto liberado ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )**
MPSi-NP	$18.42 \pm 0.25$	$11.66 \pm 0.08$	63	69.9
SNP	18.42	$3.29 \pm 0.17$	18	69.9

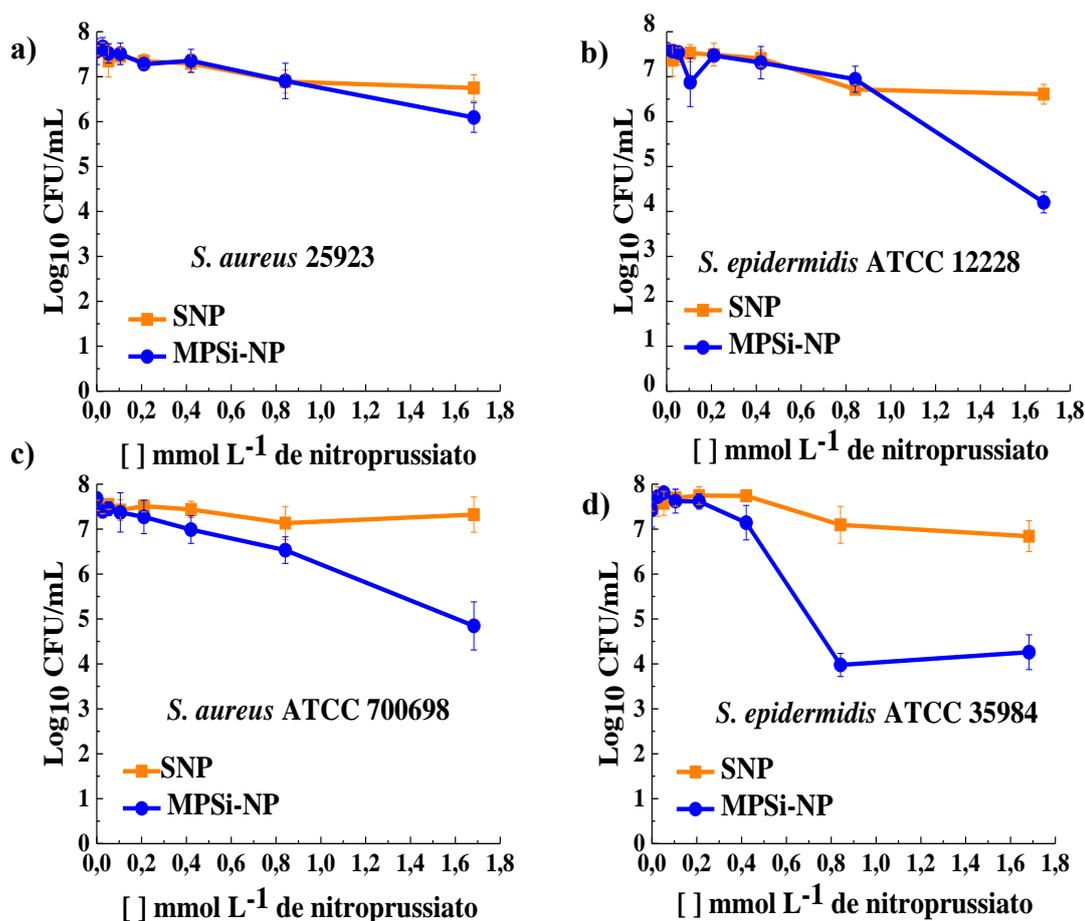
\*para  $5.5 \text{ mg}$  de nitroprussiato livre ou encapsulado ( $55 \text{ mg}$  de MPSi-NP) e \*\*Por grama de nitroprussiato livre ou encapsulado.

Fonte: O autor

#### 5.4.2 Testes antibacterianos

As MPSi não apresentaram atividade antibacteriana. O SNP apresentou atividade moderada, porém as MPSi-NP foram capazes de reduzir as células viáveis em 641 vezes para a *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e 1445 vezes para a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Gráfico 40 e Tabela 7).

**Gráfico 40.** Efeito do nitroprussiato (SNP), e nanopartículas de sílica mesoporosa com nitroprussiato (MPSi-NP) na suscetibilidade de biofilmes para bactérias sensíveis: a. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e b. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e as bactérias resistentes: c. *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e d. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.



Fonte: O autor

As MPSi-NP mostraram atividade antibiofilme em concentrações na faixa de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> para *S. epidermidis* ATCC 35984 e 5 mg mL<sup>-1</sup> *S. aureus* ATCC 700698, essas concentrações estão próximas a outros trabalhos envolvendo liberadores de NO a base de sílica, até os constituídos de diazeniodiolatos. Esses resultados indicam que as MPSi-NP apresentam eficiência próxima aos diazeniodiolatos incorporado, sendo, no entanto, mais acessível por não precisar de NO em alta pressão. Além disso para *S. epidermidis* ATCC 35984 não foi encontrado trabalhos envolvendo metodologia semelhante, assim, impossibilitando comparativos e indicando a necessidade de estudos mais aprofundados.

**Tabela 7.** Diferença de UFC para SNP e MPSi-NP para *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984 para maiores concentrações de nitroprussiato.

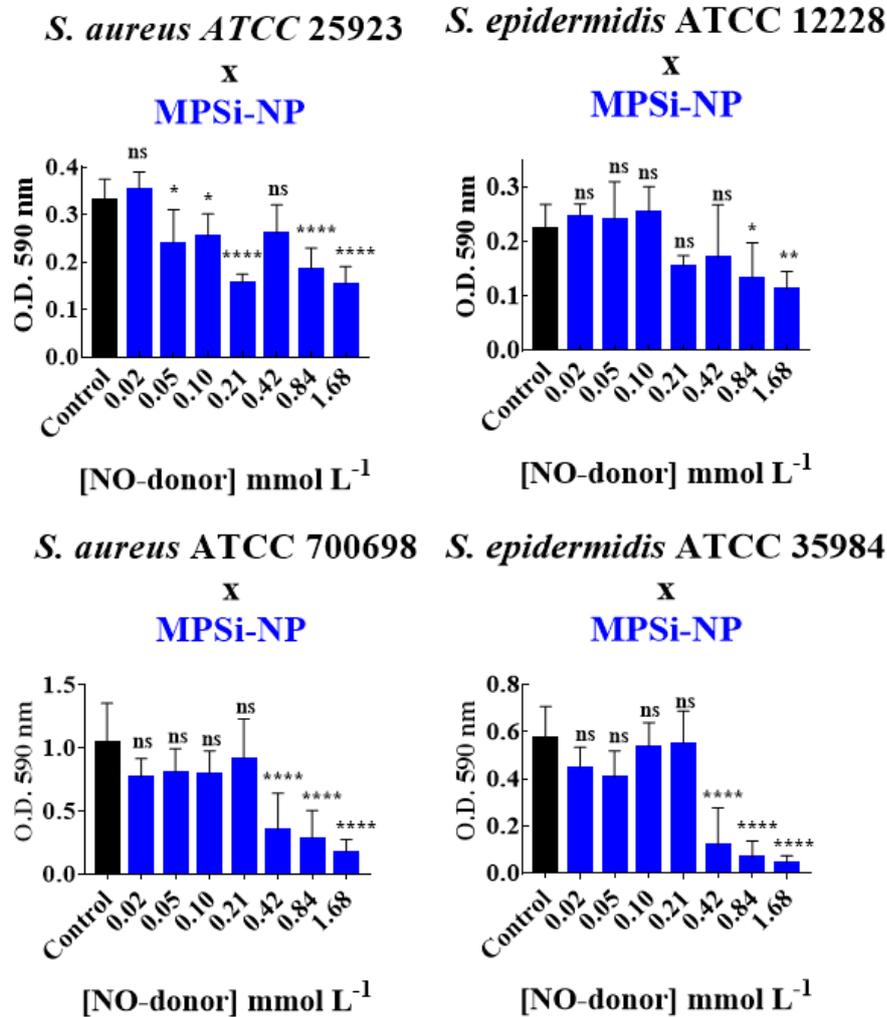
Diferença do Log <sub>10</sub> UFC		
Cepas	SNP	MPSi-NP
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.83 ± 0.31	1.47 ± 0.44
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.96 ± 0.33	3.41 ± 0.24
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	0.20 ± 0.41	2.83 ± 0.55
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0.76 ± 0.40	3.16 ± 0.54

#### 5.4.3 Quantificação de biomassa

As MPSi-NP foram capazes de inibir o acúmulo de biomassa em todas as concentrações testadas (Gráfico 41), com níveis de redução variando de 25% a 99%. Esses resultados, juntamente com a quantificação de células viáveis aprisionadas em biofilme, suportaram um papel importante na redução da formação de biofilme. É bem conhecido que a principal razão para a virulência das bactérias do gênero *Staphylococcus* reside na formação de biofilme, o que a torna tolerante a antibióticos [32]. De acordo com os resultados, o MPSi-NP pode amplificar a ação da ampicilina ao reduzir a produção de biofilme. Portanto, temos fortes indícios sobre a ação benéfica do MPSi-NP.

**Gráfico 41.** Efeito do MPSi-NP na susceptibilidade de formação de biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis*. Quantificação da biomassa de biofilmes em formação. O eixo x no valor zero representa bactérias não tratadas usadas como controle. As barras de erro representam a média

SEM, com  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $0,0002$  (\*\*),  $0,0021$  (\*\*),  $0,0332$  (\*),  $0,1234$  (ns), comparando a média de cada coluna com a média de uma coluna de controle



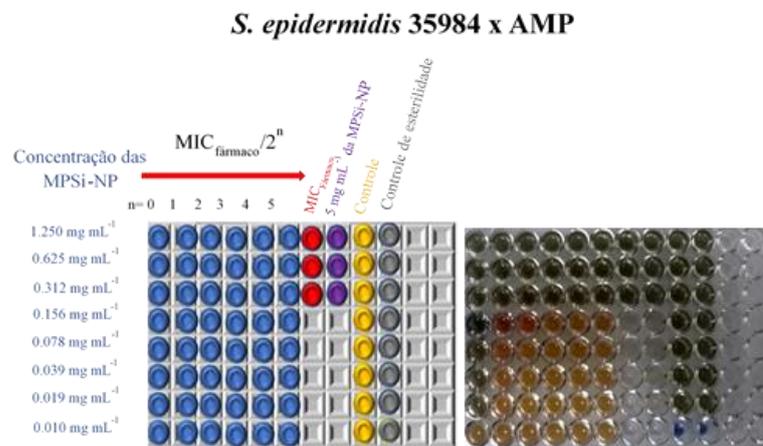
Fonte: O autor

#### 5.4.4 Avaliação do efeito das MPSi-NP associados aos antibióticos padrões

A tabela 8 apresenta a ação combinada entre as MPSi-NP e os antibióticos ampicilina (AMP), e tetraciclina (TETRA) e o Gráfico 42 apresenta o resultado do ensaio com resazurina para a combinação de MPSi-NP x ampicilina (AMP).

Apesar das MPSi-NP não apresentarem atividade inibitória e bactericida na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  seu uso combinado, mesmo em concentrações menores de  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ , foi capaz de reduzir o CIM do antibiótico ampicilina pela metade para *aureus* ATCC 700698 e quatro vezes para *S. epidermidis* ATCC 35984.

**Gráfico 42.** Resultado da revelação por resazurina para ação associada da ampicilina das MPSi-NP frente a *S. epidermidis* ATCC 35984.



Fonte: O autor

**Tabela 8.** Menores concentrações dos antibióticos ampicilina (AMP) e tetraciclina (TETRA) nas quais foram observados CIM e as respectivas concentrações de MPSi-NP contra *S. aureus* ATCC 700698 e contra *S. epidermidis* ATCC 35984.

Bactéria	Material MPSi-NP mg mL <sup>-1</sup>	Antibiótico		Redução do MIC MIC <sub>(combinado)</sub> /MIC <sub>(isolado)</sub>
		AMP CIM μg mL <sup>-1</sup> (isolado)	AMP CIM μg mL <sup>-1</sup> (combinado)	
<i>S. aureus</i> 700698	1.250	25	12.5	1/2
<i>S. epidermidis</i> 35984	1.250	1000	250	1/4
<i>S. aureus</i> 700698	MPSi-NP -	TETRA 50	TETRA 50	0

Fonte: O autor

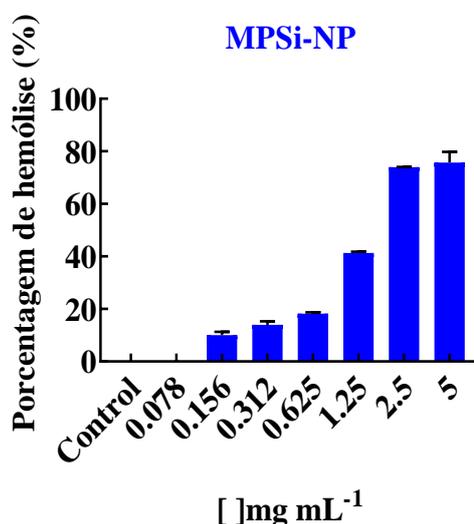
O efeito combinado das MPSi-NP com a ampicilina se deve, provavelmente, a capacidade do NO de diminuir a resistência bacteriana devido a dispersão do biofilme[145]. Nota-se uma eficiência das MPSi-NP para *S. epidermidis*, esse fenômeno pode estar relacionado a resistência dessas bactérias ser decorrente da formação de biofilme, sendo assim, o fator de virulência definidor associado à doenças causadas por esse patógeno[155]. Além disso, a ampicilina atua na degradação da parede celular ao contrário da tetraciclina que atua nos ribossomos o que pode estar relacionado a inatividade observadas das MPSi-NP combinadas a tetraciclina, porém, é necessário realizar estudos mais aprofundados.

#### 5.4.5 Ensaio de atividade hemolítica para as MPSi-NP

Foram obtidas altas porcentagens de hemólise (73-64%) para concentrações maiores que  $0.312 \text{ mg mL}^{-1}$ , porém, para concentrações de  $0.312 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0.156 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0.078 \text{ mg mL}^{-1}$  as porcentagens foram de 14%, 9% e 0%. (Gráfico 43).

O uso combinado das MPSi-NP com antibióticos (ampicilina e tetraciclina) foi capaz de reduzir a concentração das MPSi-NP a níveis menos tóxicos, indicando a possibilidade de utilizá-las em tratamentos menos agressivos com administração tópica combinado a outros antibióticos[156].

**Gráfico 43.** Porcentagem de hemólise das MPSi-NP para concentrações na faixa de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0.078 \text{ mg mL}^{-1}$



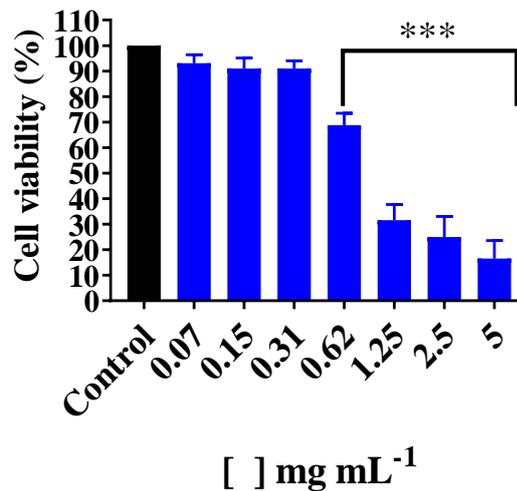
Fonte: O autor

#### 5.4.6 Citotoxicidade

Estudos anteriores indicaram que as MPSi-NP apresentam reduzida citotoxicidade em relação a concentrações equimolares de nitroprussiato livre. Além disso, a avaliação de viabilidade celular de células de mamíferos, fibroblastos murinos normais (NCTC-CL929) mostrou que redução de viabilidade celular de  $47,73 \pm 2,82\%$  ( $p = 0,0005$ ),  $37,60 \pm 2,66\%$  ( $p = 0,0132$ ) e  $28,20\% \pm 5,05\%$  ( $p = 0,0246$ ) na população de células, para as concentrações de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,62 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,31 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$  (Gráfico 44). Esses resultados dão indícios de seletividade para potencial uso do sistema. Um efeito sinérgico da combinação de MPSi-NP com ampicilina é observado para a concentração de  $1.25 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $0.40 \mu\text{M}$  de nitroprussiato), valor limite a citotoxicidade para as MPSi-NP. Para hemólise abaixo dessa concentração é observado redução de toxicidade.

**Gráfico 44.** viabilidade celular para fibroblastos de camundongo (ATCC® CCL-1) tratados com MPSi-NP por 24 h. Todas as medições foram feitas em triplicado. \*\*\* p <0,05 quando comparado ao controle.

#### MPSi-NP x murine fibroblasts (ATCC® CCL-1)



Fonte: O autor

#### 5.5 Conclusão do Capítulo 4

A estrutura da sílica funcionou como facilitadora da liberação de óxido nítrico em condições ambiente (temperatura corporal e em luz ambiente), potencializando a atuação antibacteriana. As MPSi-NP atuaram na inibição/dispersão do biofilme de cepas sensíveis e resistentes, chegando a uma redução de 1445 vezes contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. Mesmo sem atividade inibitória e bactericida, o uso combinado das MPSi-NP com antibióticos comprovou a atuação das MPSi-NP na redução da resistência das bactérias resistentes, apontando para um potencial uso em tratamentos em infecções causadas por esses patógenos. Vislumbra-se assim, o uso das MPSi-NP em tratamento menos invasivos, como administração tópica combinado a outros antibióticos.



## Formulações

### 6 CAPÍTULO 5. PRODUÇÃO DE FORMULAÇÕES LIBERADORAS DE NO A BASE DAS MPSI-NP

#### 6.1 Introdução

Trabalhos indicam ação antinociceptivo (redução na capacidade de perceber a dor) do óxido nítrico[157–165](Gráfico 45), que em doses de 250 e 500 µg de nitroprussiato provoca um efeito antinociceptivo periférico em patas de ratos[162]. Prado, Schiavon e Cunha (2002) estudaram os efeitos da aplicação local de creme contendo doadores de óxido nítrico em incisões e perceberam a redução da alodinia (sensação de dor quando, normalmente, o estímulo não é doloroso)[163]. A ação analgésica do óxido nítrico depende de uma via de sinalização intracelular, isso inclui a formação de GMP cíclico, ativação de PKG e a consequente abertura de canais de  $K^+$ . A abertura desses canais aumenta a corrente  $K^+$  causando hiperpolarização de neurônios nociceptivos, inibindo o disparo nervoso e pré-sináptica da liberação de transmissor[166].

**Gráfico 45.** Representação do caminho para a ação analgésica do óxido nítrico.



Fonte: O autor

A neuropatia periférica é uma dor crônica causada pela danificação dos nervos sensitivos do Sistema Nervoso Central e/ou Periférico e está presente em aproximadamente 10% da população, causando diferentes sensações de dor e podendo levar a incapacidade. Seus sintomas são: formigamentos, perda de sensibilidade nas extremidades, principalmente pés e mãos, perda de força, atrofia e dor espontânea[167].

Observa-se grande interesse no desenvolvimento de fármacos e tratamentos que visam a redução dos males causados por neuropatia periférica. Uma rápida busca no portal <https://patents.google.com/>, com os termos “Nitric Oxide” e “Neuropathy” com os seguintes limitantes, *status: application, type: patents e Litigation; No Known Litigation* deram 18.859 resultados. Destaca-se aqui a utilização de liberadores de NO para uso tópico (Tabela 9).

**Tabela 9.** Algumas patentes que tratam do uso de NO em tratamento de neuropatia

Título	Ano de submissão	Países e organizações submetidos (sigla)
Methods and Compositions Comprising Nitric Oxide Donors and Opioid Analgesics	2005	JP e WO
Device Method, And Use for Treatment of Neuropathy Involving Nitric Oxide	2006	EP, WO, MX, DE, ES, DK e JP
Topical dermal delivery device for nitric oxide delivery	2007	JP, RU, WO e EP
Nitric oxide releasing compounds for the treatment of neuropathic pain	2011	WO e AR
Techniques and systems for treatment of neuropathic pain and other indications	2012	WO e US
Diabetes foot treatment instrument	2018	CN

Siglas: Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WO) E Organização Européia de Patentes (EP)

No mercado farmacêutico há o creme *Neuro One* que contém L-arginina o qual produz NO indiretamente para tratamento de neuropatia.

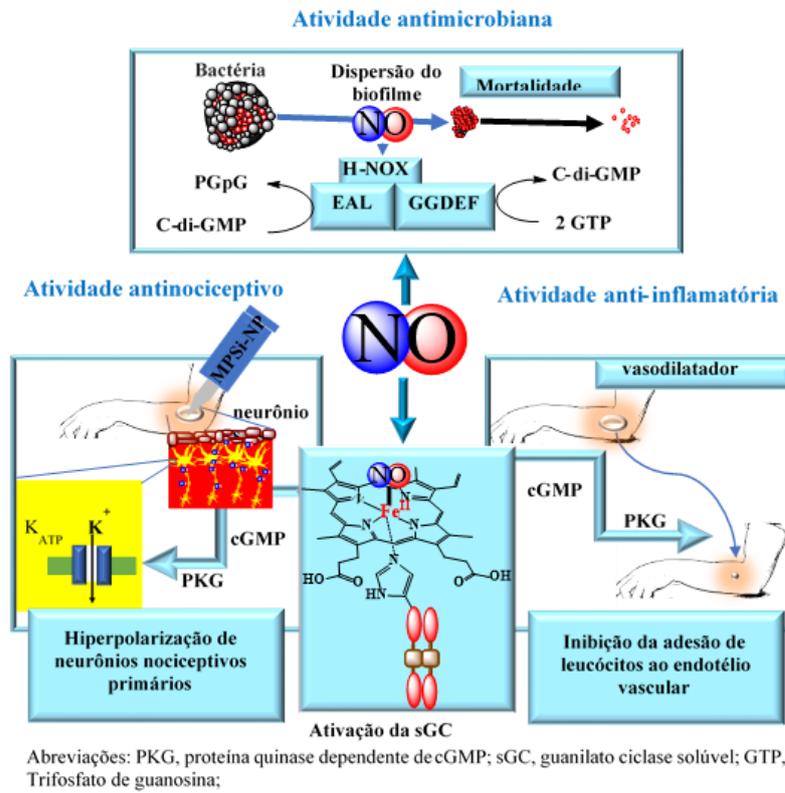
### 6.1.1 Fibra de algodão contendo as MPSi-NP

Sabendo que há diversos relatos na literatura sobre a adesão de materiais de sílica em algodão[168–173], este trabalho pretende fazer um estudo preliminar de adesão das MPSi-NP em tecidos de algodão (algodão-MPSi-NP), os quais poderão liberar de forma lenta e controlada o NO para a pele, causando alívio de dores.

### 6.1.2 Gel contendo doadores de NO

O uso tópico das MPSi-NP é atrativo principalmente pelas múltiplas atividades do NO: vasodilatador, antinociceptiva e inibição da agregação plaquetária. A ação anti-inflamatória, ocorre pela vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local do edema[174] e a inibição da agregação e adesão plaquetária e redução do recrutamento de leucócitos[175](Gráfico 46). Por isso, neste trabalho, produziu-se um gel para uso tópico (Gel-MPSi-NP) e avaliou-se a entrega de NO via dialise.

**Gráfico 46.** Atuação do NO em tratamento de feridas



Fonte: O autor

## 6.2 Objetivos

### 6.2.1 *Objetivos Geral*

Produzir fibras de algodão contendo partículas liberadoras de óxido nítrico para confecção de meias, luvas e bandanas para tratamento de neuropatia.

### 6.2.2 *Objetivos Específicos*

- Aderir as MPSi-NP em fibras de algodão (algodão-MPSi-NP);
- Estudar a estabilidade térmica e física do algodão-MPSi-NP;
- Estudar a liberação de NO e cianeto do algodão-MPSi-NP em condição ambiente;
- Realizar cinética de liberação de NO das MPSi-NP e Algodão-MPSi-NP em estado sólido;
- Produzir um gel hidrofílico contendo as MPSi-NP, carbopol 940 e trietanolamina (Gel-MPSi-NP)
- Avaliar a sua capacidade de entrega de NO do gel-MPSi-NP através de dialise

## 6.3 Metodologia

### 6.3.1 Adesão das MPSi-NP em algodão

#### 6.3.1.1 Adesão das MPSi-NP sobre algodão (algodão-MPSi-NP)

Em um balão contendo 1 g de MPSi foram adicionados 20 mL de uma solução de nitroprussiato  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e mantido sob agitação por 24 h. Depois, o material foi centrifugado e lavado três vezes e redisperso em um 300 mL de etanol, adicionou-se 10 g de algodão e o sistema foi mantido sob agitação por 4 horas. O algodão foi retirado do meio, prensado e seco a temperatura de  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 hora. O material foi lavado com água para remover as MPSi-NP em excesso. Todos os procedimentos foram realizados sob proteção da luz. O nitroprussiato aderido ao algodão foi quantificado por espectrofotometria na região do visível (UV-vis), onde uma amostra de 50 mg de Algodão-MPSi-NP foi imersa em 5 mL de uma solução NaOH  $3 \text{ mol L}^{-1}$  e agitado por 2 minutos e a absorbância do sobrenadante foi medido em 398 nm.

#### 6.3.1.2 Quantificação de NO

Para a quantificação, 69 mg de Algodão-MPSi-NP foram imersos em 20 mL de água destilada e irradiado com luz LED por 24 horas. Depois, o sobrenadante foi diluído para 1:2 e misturado com 0,40 mL de reagente de Griess. A absorbância da solução foi medida em 543 nm.

#### 6.3.1.3 Ensaios de liberação MPSi-NP em KBr

Para avaliação a degradação do íon nitroprussiato presente nas MPSi-NP, utilizou-se uma pastilha de KBr com 3% (m/m) da amostra, a qual foi exposta a condições ambiente (luz, temperatura e ar atmosférico). Espectros de absorção de IV, na faixa de 400 a  $4.000 \text{ cm}^{-1}$ , foram então obtidos em intervalos de 0 a 720 horas.

#### 6.3.1.4 Cinética de liberação de NO em estado sólido

Amostras do material Algodão-MPSi-NP foram deixadas sob condições naturais: sem proteção de luz, em contato com ar atmosférico e oscilações de temperatura durante o dia. Então, 50 mg desse material foi dissolvidos em 5 mL de solução de NaOH  $3 \text{ mol L}^{-1}$  e agitado por 2 minutos e a absorbância do sobrenadante foi medido em 398 nm em intervalos de tempo de: 0, 24, 48, 72, 96, 240, 336, 456, 576 e 696 h.

#### 6.3.1.5 Monitoramento cianeto

Cianeto liberado ao final do processo de liberação d NO foi monitorado de forma semiquantitativa utilizando o kit eXact® Cyanide- Complete Visual Kit. Para isso, 250 mg de Algodão-MPSi-NP foi imerso em 10 mL de água destilada sob agitação durante 20 min e a concentração de cianeto medida.

#### 6.3.1.6 Caracterização do algodão-MPSi-NP

##### 6.3.1.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Informações sobre a morfologia das nanopartículas como: dispensabilidade, tamanho e forma das partículas foram obtidos através de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se um microscópio QUANTA-FEG da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. Uma suspensão da amostra em etanol foi sonicada por 30 min e gotejada em um suporte de alumínio contendo uma tira de carbono, recoberta por um filme de ouro (~20nm).

##### 6.3.1.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no intervalo de número de onda avaliado de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , sendo utilizadas pastilhas de KBr contendo 2% (m/m) da amostra. O equipamento utilizado foi da marca ABB, modelo FTLA 2000, localizado no Grupo de Bioinorgânica, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

##### 6.3.1.6.3 Análise Termogravimétrica

Medidas termogravimetrias (TG) foram realizadas visando à obtenção de informações da estabilidade térmica e estimativa da quantidade dos grupos orgânicos ancorados na sílica nas etapas de funcionalização. As curvas foram obtidas em porta amostra de alumina, na faixa de 25 °C a 1000 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de oxigênio. As análises foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade Federal do Ceará (LCTM-UFC) no Departamento de Física da UFC, em uma termobalança modelo TGA-60 da marca SHIMADZU.

### 6.3.2 Gel liberador de NO

#### 6.3.2.1 Produção de Gel-MPSi-NP

Produziu-se um gel hidrofílico a base de carbopol 940 e MPSi-NO na concentração de 0,5 % (m/m). Para produção do gel utilizou-se 0,250 g de carbopol 940, e este foi completamente dissolvido em 25 mL de uma solução trietanolamina (2%) formando um gel espesso, em paralelo, 0,250 g de MPSi-NP foram dispersos em 25 mL da solução de trietanolamina 2% em banho ultrassônico por 8 min. Logo depois, a dispersão foi adicionada ao gel até a formação de um gel homogêneo de cor azul/lilás.

#### 6.3.2.2 Cinética de liberação de NO e quantificação do cianeto final via dialise do Gel-SNP e Gel-MPSi-NP

Para avaliar a capacidade de entrega de NO do gel, realizou-se dialise e quantificação de NO e cianeto liberado. Seguiu-se a metodologia já relatado na seção anterior (Capítulo 3, seção 3.1). Para tal, utilizou-se 11 g do gel em uma bolsa de diálise a qual foi imersa em 200 mL de água em um erlenmeyer de 500 mL e este foi fixado em um shaker e mantido sob agitação branda a 37 °C. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em intervalo de tempo (0, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h) e a partir do período de 24, 48, 72 e 96 h foram coletadas alíquotas de 0,250 mL as quais foram adicionados 0,750 mL de água para completar o volume final de 1 mL. Em todas as alíquotas foi adicionado 40 µmL do reagente de Griess e analisadas por UV-vis. Ao final das 96 h foi retirada uma alíquota de 2 mL e transferida à uma cubeta através da qual foi analisada a quantidade total de cianeto.

#### 6.3.2.3 Atividade antibacteriana do Gel-MPSi-NP

Para a realização deste ensaio, utilizou-se o método de difusão em disco de ágar. Primeiramente, 10 mL de ágar TSB foi derramado sobre a placa de Petri, após solidificação, 100 µL de uma dispersão de bactéria contendo  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> para *S. epidermidis* ATCC 35984 e 200 µL de uma suspensão de  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> para *S. aureus* ATCC 700698 foram gotejados no centro e distribuídos sobre o ágar usando alça de Drigalski. Logo em seguida, foi adicionado gotas de gel de massa entre 12 e 21 mg do gel (Tabela 10) os quais formaram disco de  $4,6 \pm 0,5$  mm de diâmetro. A zona de inibição foi determinada após 24 h de incubação a 37°C.

**Tabela 10 .** Massa obtidas para as gotas das diferentes formulações.

Formulações	Massa das gotas (mg)
Gel	12,01 ± 1,4
Gel-NP	12,3 ± 0,7
Gel-MPSi-NP	18,2 ± 3,7

Fonte: O autor

## 6.4 Resultados e Discussão

### 6.4.1. Algodão-NP

#### 6.4.1.1. Adesão da MPSi-NP em algodão

NO Gráfico 47 observa-se a alteração de cor do algodão de branco para uma coloração cinza-lilás, fornecendo indícios da incorporação das MPSi-NP. A banda em 1935 cm<sup>-1</sup> do FTIR para o Algodão-MPSi-NP indica a presença de nitroprussiato (NP) na estrutura do algodão corroborando para hipótese de adesão e conservação do NP durante o processo de impregnação das MPSi-NP. A Tabela 11 apresenta atribuições das bandas presentes nos espectros de IR do algodão[176] e algodão-MPSi-NP.

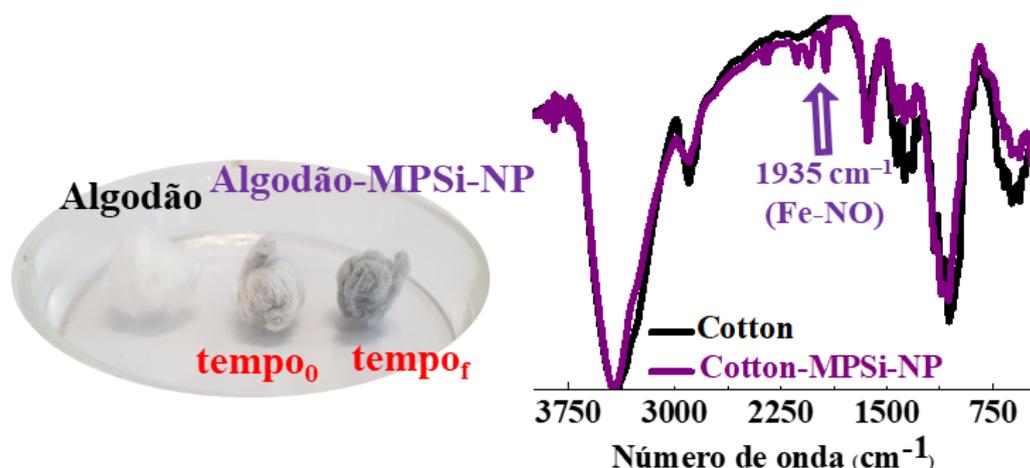
**Tabela 11.** Tentativa de atribuição das bandas observadas durante o processo de síntese e modificação do algodão com MPSi-NP

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3650–3100	v O-H
2980–2800	v-CH
1935	Nitroprussiato
1640	H <sub>2</sub> O adsorvido
1433	δ (CH) (flexão no plano)
1372	δ (CH)
1338	δ (CH), v(C <sub>1</sub> -O)
1320	δ (CH)
1281	v <sub>as</sub> (C-O)
1169	v <sub>as</sub> (C-O-C)
1113	v <sub>as</sub> (C-O-C)
1031	v <sub>as</sub> C-O

Fonte: O autor

Através microscopias eletrônicas de varredura do algodão-MPSi-NP (Gráfico 48), observa-se que as nanopartículas de sílica mesoporosa estão espalhadas em toda a fibra do algodão. Como o algodão natural carrega cargas negativas em solução aquosa, as interações entre fibra e partículas são, portanto, predominantes pelas forças de Van de Waal, em vez de forças eletrostáticas[169].

**Gráfico 47.** Espectro de FTIR para o algodão antes e após a impregnação das MPSi-NP.

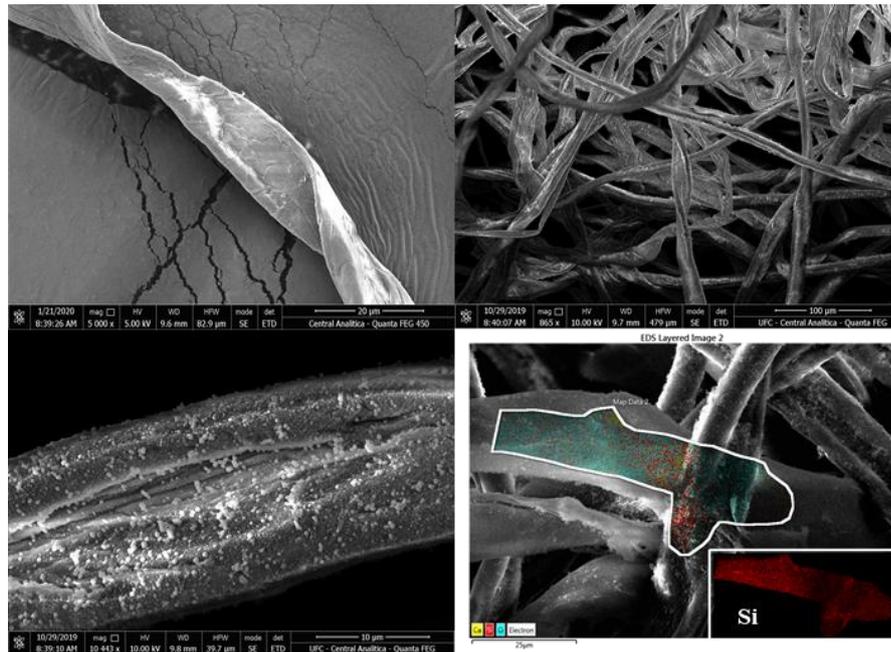


Fonte: O autor

As análises termogravimétricas (Gráfico 49) indicaram a interação das MPSi-NP na estrutura do algodão. Por meio da análise de TGA não foi possível quantificar a presença de MPSi-NP, sugerindo uma pequena porcentagem de impregnação deste material à fibra. No entanto, pelas análises de TGA e DTA foi possível observar quatro eventos: o primeiro entre 26 °C e 300 °C (endotérmico) é atribuído à evaporação de água e compostos voláteis adsorvidas nas fibras de algodão, o segundo entre 300 °C e 350°C (exotérmico) correspondente a degradação da celulose, o terceiro entre 325 °C e 356°C é atribuído a processos de cristalização de carvão (endotérmico) e quarto depois de 350 °C é devido a degradação completa do material orgânico (exotérmico)[177,178].

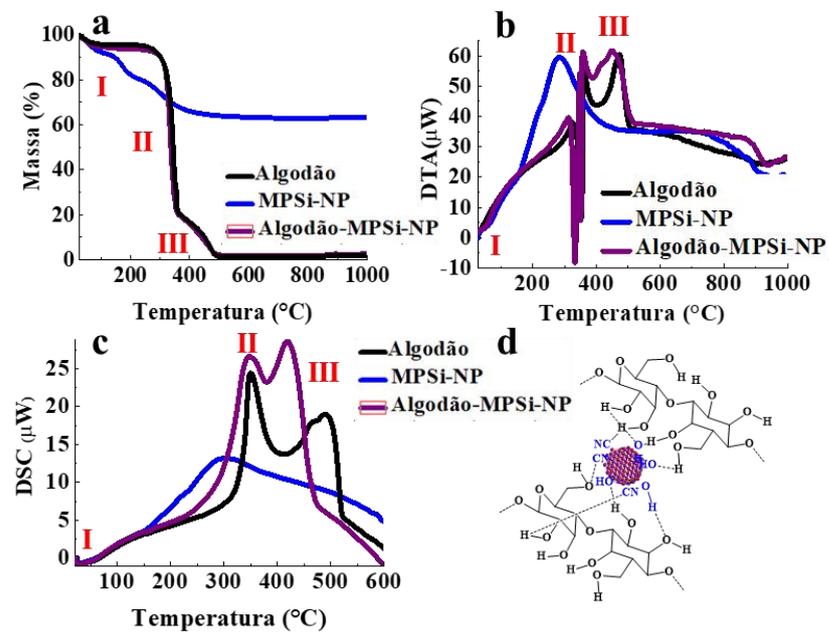
Apesar das MPSi-NP não estarem em quantidades identificáveis, o DTA e o DSC indicam a interação do material com a fibra de algodão. Observa-se a redução da temperatura dos processos envolvidos na decomposição térmica do algodão: (I) de 350 °C para 345°C (degradação da celulose), (II) de 356°C para 336 °C (cristalização do carvão) e (III) de 490 °C para 468 °C (degradação do restante do material orgânico). Esses deslocamentos corroboram para hipótese da interação entre as nanopartículas e o algodão.

**Gráfico 48.** MEV e EDX das fibras de algodão após a adsorção das MPSi-NP.



Fonte: O autor

**Gráfico 49.** TGA, DTA e DSC para algodão, MPSi-NP e algodão-MPSi-NP

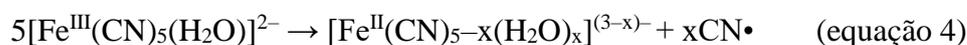
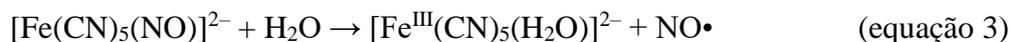


Fonte: O autor

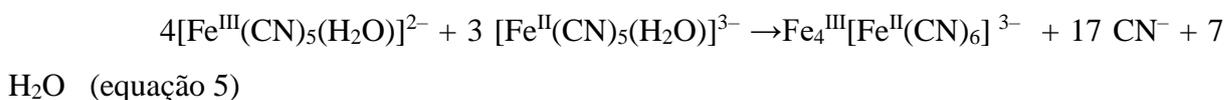
#### 6.4.1.2. Cinética de liberação de NO

O Gráfico 50 apresenta os espectros de FTIR acompanhados durante 30 dias para a liberação de NO das MPSi-NP e algodão-MPSi-NP. Observa-se o aparecimento das bandas em

2115  $\text{cm}^{-1}$  e 2040  $\text{cm}^{-1}$ , que foram atribuídas à formação das espécies aquaferrocianeto, dadas pelas equações 3 e 4, respectivamente[105].

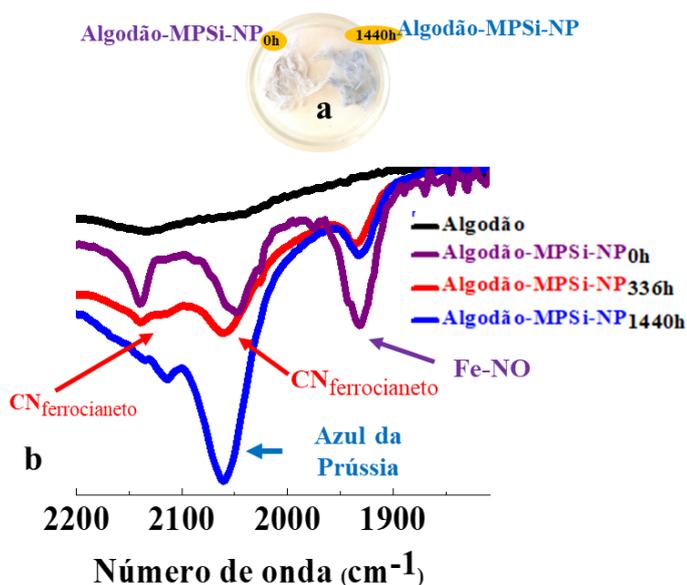


A banda em torno de 2066  $\text{cm}^{-1}$  é consistente com a formação de complexos de valência mista, azul da Prússia ( $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) [105], descrita pela Equação 3. Observa-se, pelo espectro de FTIR, um aumento de sua intensidade com o tempo.



Além da mudança de cor observa-se também a redução de intensidade das bandas do NO em 1935  $\text{cm}^{-1}$  e 2141  $\text{cm}^{-1}$ , referentes ao íon nitroprussiato nas Algodão-MPSi-NP. Esta mudança corrobora com dados da literatura envolvendo nitroprussiato livre em solução.

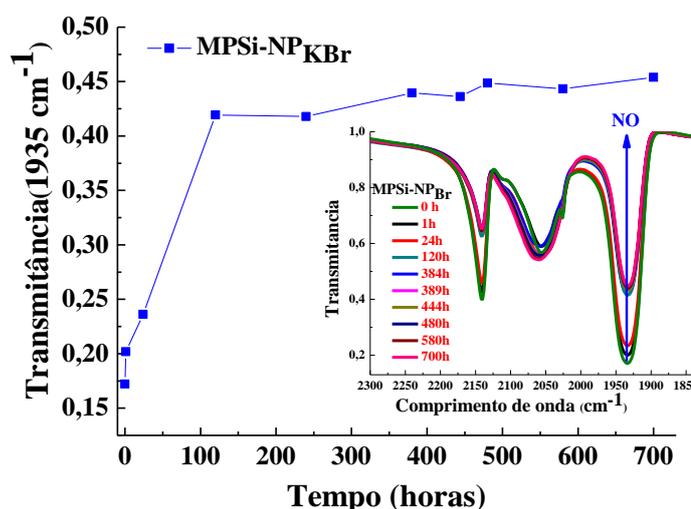
**Gráfico 50.** (a) o comparativo em imagem do algodão-MPSi-NP durante 1440 h protegido e exposto a luz ambiente e (b) FTIR das MPSi-NP em pastilha de KBr durante o tempo na faixa 2300-1800  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: O autor

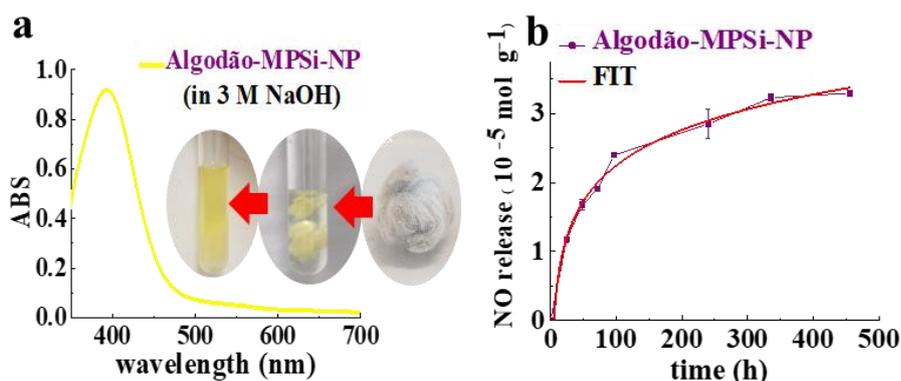
O Gráfico 51 apresenta a cinética de liberação para as MPSi-NP e o Gráfico 52 para o algodão-MPSi-NP. Observa-se comportamentos similares, ocorre a liberação de NO por aproximadamente 336 h (14 dias).

**Gráfico 51.** Cinética de liberação de NO da MPSi-NP em pastilha de KBr durante 700 h



Fonte: O autor

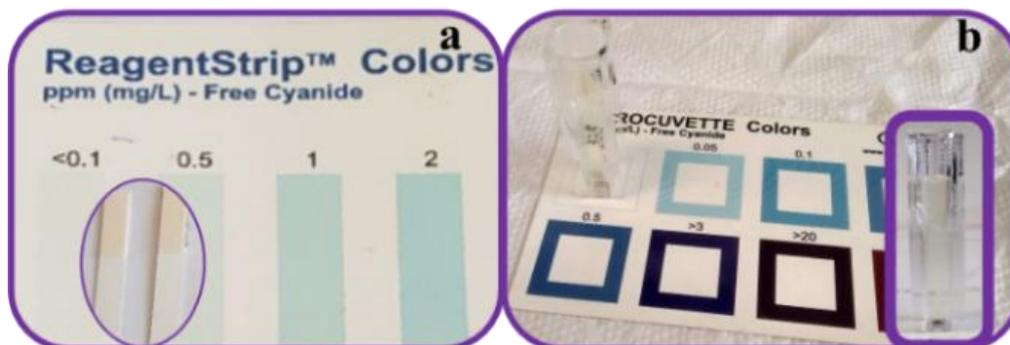
**Gráfico 52.** Cinética de liberação de NO para o algodão-MPSi-NP. input: imagem e espectro do algodão-MPSi-NP em solução de NaOH 3 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor

O valor máximo de liberação de NO foi de  $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ . O teste semiquantitativo de cianeto indicou ausência de  $\text{CN}^-$  livre (Gráfico 53) apontando para uma segurança quanto ao uso do sistema algodão-MPSi-NP.

**Gráfico 53.** Resultado do kit eXact® Cyanide- Complete Visual Kit para 250 mg de algodão em 10 mL de água. (a) comparativo entre a cor da fita indicativa (b) análise semiquantitativa em solução



Fonte: O autor

Soares et al. (2000) notaram que doses intraplantar de 250  $\mu\text{g}$  (0,84  $\mu\text{mol}$ )/pata e 500  $\mu\text{g}$  (1,68  $\mu\text{mol}$ )/pata apresentam efeito antinociceptivo periférico, considerado local, uma vez que apenas doses mais altas produziram efeito na pata contralateral[162]. Vercelino et al. (2013) estudaram o efeito da aplicação de glutatona modificada com NO (GSNO) e observaram liberação de NO na quantidade de 13 nmol em 10 min.[164] A aplicação dérmica causou vasodilatação em voluntários saudáveis e redução de até a 50% da intensidade da hipernocicepção em ratos Wistar que foram submetidos a dor inflamatória.

Na tentativa de avaliar o custo de produção de materiais a base de algodão-MPSi-NP, a Tabela 12 apresenta os valores de mercado dos reagentes utilizados, o Gráfico 54 apresenta os custos envolvidos na produção de 1 g de algodão-MPSi-NP e a Tabela 13 apresenta os valores de peças (luvas e meias) sem algodão modificado e algodão modificado. Nota-se valores acessíveis e por possuírem validade 14 dias podem apresentar baixa relação custo/benefício.

**Tabela 12.** Relação dos preços dos reagentes

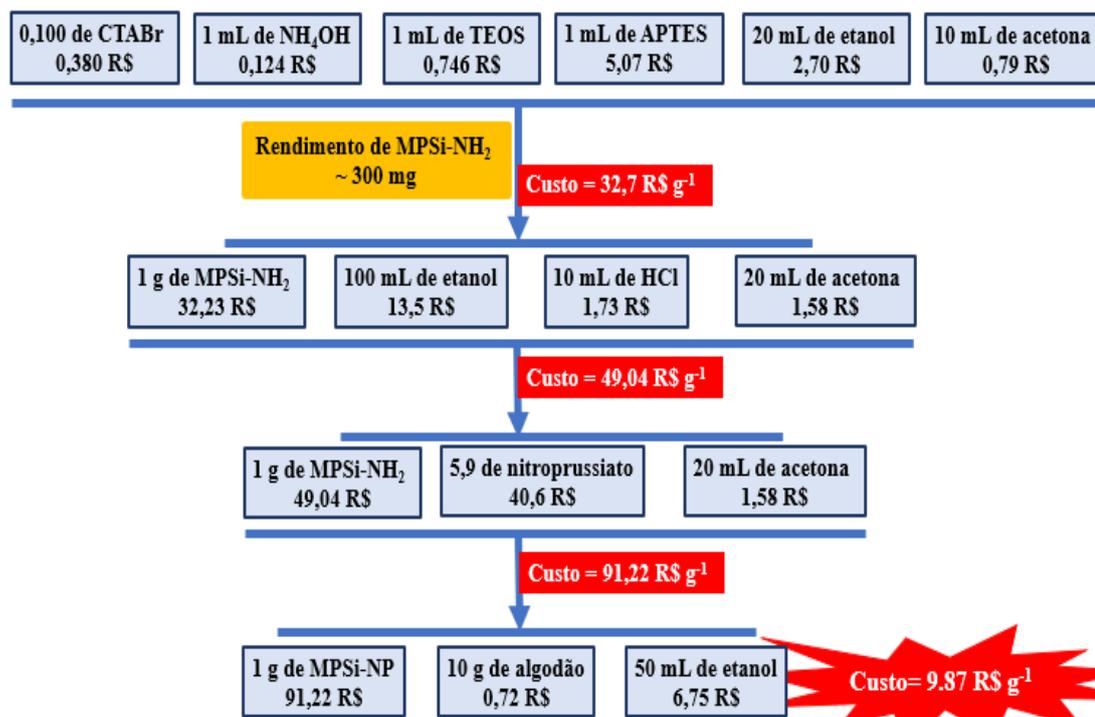
Reagente	Quantidade	Preço (R\$)
TEOS	1 L	746,00
APTES	100 mL	507,00
CTABR	100 g	380,00
ÁCIDO CLORÍDRICO	1L	173,00
NITROPRUSSIATO	100 g	688,00
NH <sub>4</sub> OH	1 L	124,00
ACETONA	1 L	79,00
ETANOL	1 L	135,00

ALGODÃO

95 g

6,88

Fonte: O autor

**Gráfico 54.** Custos envolvido na produção de 1 g de algodão-MPSi-NP

Fonte: O autor

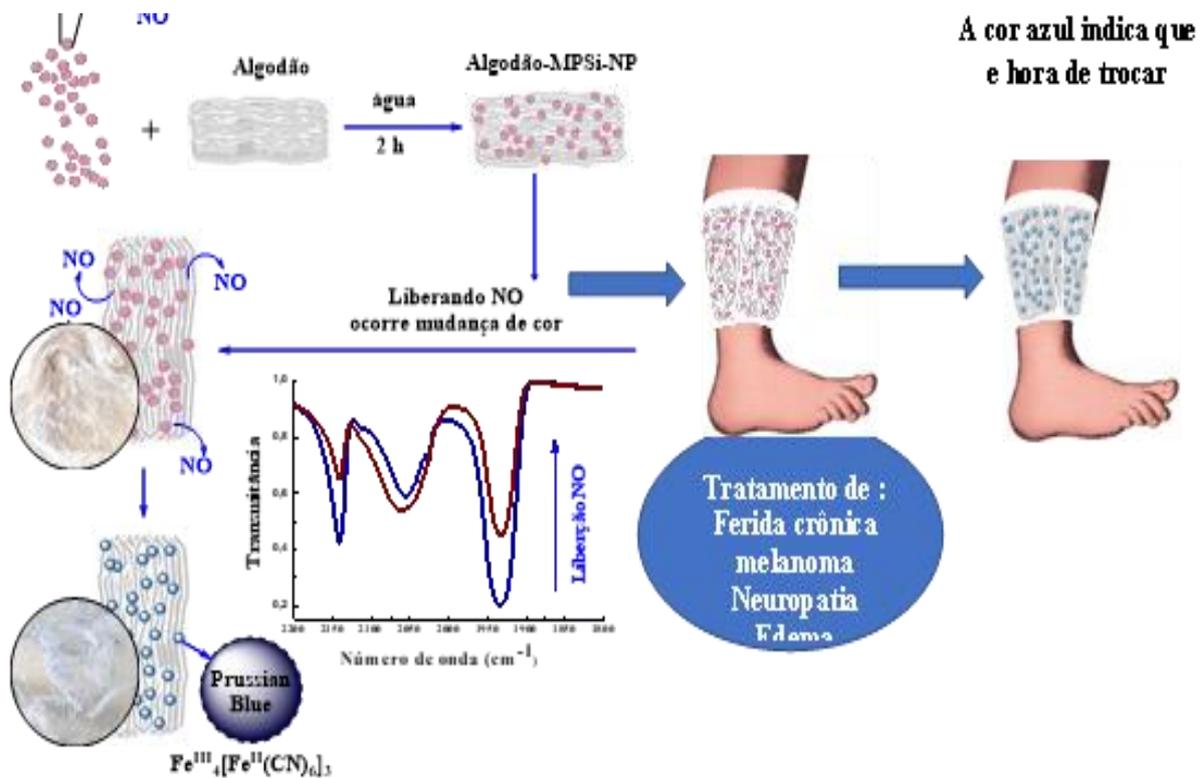
**Tabela 13.** Peso médio de itens contendo algodão, preço real e o prováveis para modificação com MPSi-NP e quantidade de NP para cada produto (valores baseados pelo Gráfico 57)

Produto	Peso (g)	Preço (R\$)	Preço com MSPi-NP (R\$)	Quantidade de NP (mmol)
Luva	50	4,90	48,36	3,36 (1,61 liberados)
Meia	89	27,90	275,37	5,98 (2,88 liberados)

Fonte: O autor

O material algodão-MPSi-NP poderia então ser utilizados na confecção de luvas e meias que estarão em contatos com os membros mais afetados (pés e mãos em tratamento de neuropatia periférica. Esse tratamento tem potencial para ser mais eficiente, diminuindo o desconforto de várias aplicações diárias, maior praticidade no uso e apressamento estético. Observa-se também alteração de cor quando o NO é liberando servindo assim de indicativo de validade do produto. Considerando ser um tratamento de logo prazo, após o uso, as luvas e meias terão descarte adequado. (Gráfico 55).

**Gráfico 55.** Esquema da adesão e aplicação do Algodão-MPSi-NP e suas possíveis aplicações



Fonte: O autor

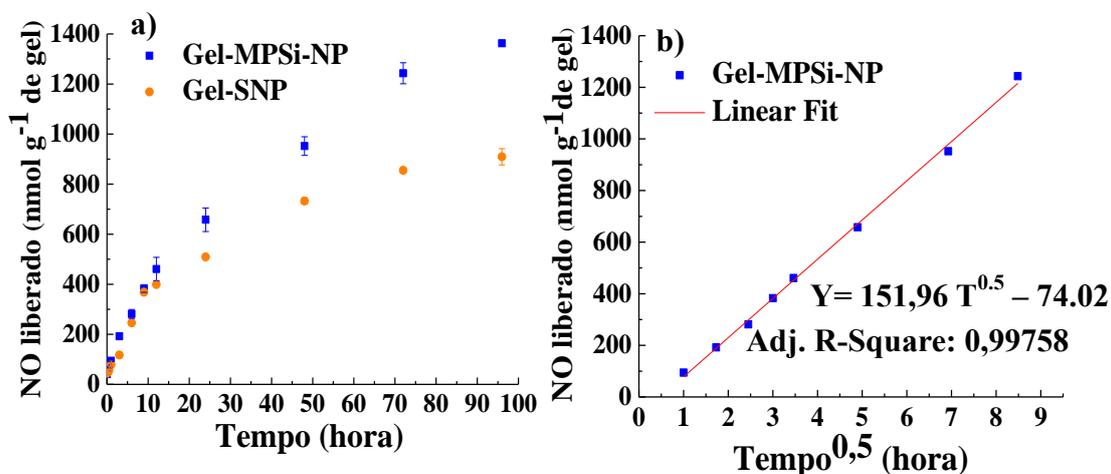
#### 6.4.2. Gel liberador de NO

##### 6.4.2.1 Cinética de dialise de NO liberado e CN<sup>-</sup> total para Gel-MPSi-NP e Gel-NP

O Gráfico 56a apresenta a quantidade NO liberado por 1 g de gel. Observa-se uma migração lenta e constante de NO para o meio, para as primeiras 24 h levando a uma liberação de  $657,69 \pm 46,8$  nmol para o gel-MPSi-NP e  $509,2 \pm 1,3$  nmol  $\text{g}^{-1}$  para o gel-SNP. Surpreendentemente, a liberação ocorre durante 4 dias (96 horas) totalizando  $1362,7 \pm 10$  nmol  $\text{g}^{-1}$  e  $909,43 \pm 32,58$  nmol  $\text{g}^{-1}$  para gel-MPSi-NP e gel-SNP, respectivamente (Tabela 14).

O gráfico do  $\text{tempo}^{0,5} \times \text{NO liberado}$  para o gel-MPSi-NP (Gráfico 56b) trata-se de uma liberação regida por difusão simples determinada pela equação NO liberado (nmol  $\text{g}^{-1}$ ) =  $151,96 t^{0,5} - 74,02$ . Para ambos os casos, a quantidade de cianeto liberada está dentro da faixa de segurança para aplicação dérmica quando comparada a outros compostos contendo cianeto (Tabela 15).

**Gráfico 56.** a. Cinética de dialise de NO por 1 g de gel-MPSi-NP e gel-SNP durante 96 h e O gráfico do tempo<sup>0,5</sup> x NO liberado para o gel-MPSi-NP.



Fonte: O autor

**Tabela 14.** Total de óxido nítrico e cianeto liberado por 1 g de gel após as 24 h e razão de NO/CN<sup>-</sup>.

	NO liberado (nmol g <sup>-1</sup> )	Cianeto liberado (nmol g <sup>-1</sup> )	NO/CN
MPSi-NP	1362,7 ± 10	350	38,9
SNP	909,4 ± 32,58	350	26,0

Fonte: O autor

**Tabela 15.** Valores comparativos de toxicidade de compostos contendo cianeto

Substância	Taxa de exposição dérmica possíveis risco para a saúde a longo prazo (nmol/kgbw/day)	CN <sup>-</sup> liberado (nmol g <sup>-1</sup> )
Gel-MPSi-NP (0.5%)		~350
KCN	2150	1,7 x 10 <sup>7</sup>
NaCN	2041	2,0 x 10 <sup>7</sup>
	Efeitos sistêmicos agudos (nmol/kgbw/day)	
KCN	61885	1,7 x 10 <sup>7</sup>
NaCN	61836	2,0 x 10 <sup>7</sup>

Fonte: O autor

Em humanos, a concentração limite não letal (LC01) para HCN pela via de absorção dérmica em 10 minutos foi estimada em 211 mg m<sup>3</sup> (188 ppm), enquanto a LD50 em cerca de 100 mg/kgbw. Esses resultados indicam uma provável segurança do gel contendo MPSi-NP para uso tópico, uma vez que pode liberar até 9,09 µg g<sup>-1</sup>.

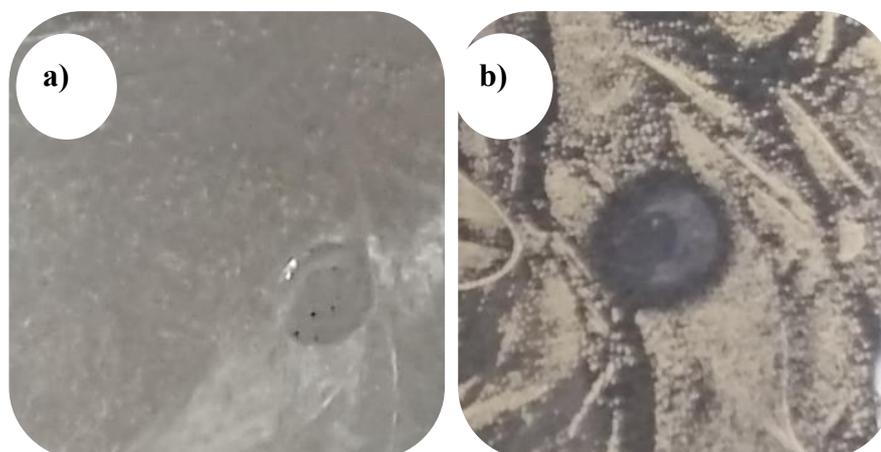
Os compostos de cianoferrato são considerados bastante seguros, uma vez que o cianeto está fortemente ligado ao ferro. De fato, existe outro medicamento contendo cianeto, o azul da Prússia (radiogardase®, aprovado pelo FDA em 2003), em uso clínico para tratar a contaminação com tálio ou césio radioativo, em que 3 a 20 g deste medicamento são administrados por via oral a humanos sem qualquer lado efeito[180]. O baixo risco pode ser ainda reduzido se este composto não for exposto a uma condição ácida, usual durante a administração oral[180]. O azul da Prússia libera  $175,31 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $6742 \text{ nmol g}^{-1}$ ) por 24 h em pH 1, o que mimetizaria o pH gástrico [108].

Os resultados até aqui obtidos, juntamente com estudos citotóxicos mostrados anteriormente, suportam a provável segurança para o uso das MPSi-NP. No entanto, para prevenir qualquer risco sistemático potencial, a formulação em gel de MPSi-NP a 0,5%, este deve ser limitado ao uso abaixo de 177 g/dia, que é considerada uma quantidade significativamente elevada de um medicamento. É importante salientar que estes resultados são somente indicativos um estudo toxicológico detalhado deve ainda ser feito.

#### 6.4.2.2 Atividade antibacteriano dos géis

Nos ensaios de atividade antibacteriana dos géis, não foi observado inibição para o gel (0,5% e TEA 2,0 %) e gel-SNP (0,5%, TEA 2,0% e SNP 0,05%). O gel-MPSi-NP (0,5%, TEA 2,0 % e MPSi-NP 0,5%) apresentou atividade inibitória frente *S. epidermidis* ATCC 35984 com diâmetro de inibição de  $7,7 \pm 0,6 \text{ mm}$  (Gráfico 57 e Tabela 16).

**Gráfico 57.** Zona de inibição para o gel-MPSi-NP (0,5%, TEA 2,0 % e MPSi-NP 0,5%) contra a. contra *S. aureus* ATCC 700698 e b. *S. epidermidis* ATCC 35984.



Fonte: O autor

**Tabela 16.** Diâmetro de zona de inibição do gel-SNP (0,5%, TEA 2,0 % e SNP 0,05%) e (0,5%, TEA 2,0 % e MPSi-NP 0,5) contra *S. aureus* ATCC 700698 e *S. epidermidis* ATCC 35984.

Bactéria	Zona de inibição (mm)		
	Gel	Gel-SNP	Gel-MPSi-NP
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	-	-	7,7 ± 0,6

Fonte: O autor

O resultado obtido para o gel-MPSi-NP pode estar associado à sua liberação estável de NO ao longo do tempo, diferentemente do SNP, indicando que apesar de modesto, gel-MPSi-NP apresenta ação antibacteriana. Mesmo assim, seu efeito pode ampliar a ação de outros agentes bactericidas, como por exemplo, no uso em pomada contendo antibióticos comerciais. Esse tipo de ação já foi observado, há outro relato de um gel contendo um doador de NO de base orgânica em associação com óxido de zinco com potencial uso terapêutico [66,121]. Estes resultados são interessantes pois abrem possibilidades para outros tipos de aplicações, tais como tratamento de feridas, neuropatias etc.

## 6.5 Conclusão do Capítulo 5

Foram obtidas fibras de algodão recobertas com as MPSi-NP capazes de liberar NO sob condições ambientes, tornando-se carreadores de NO os quais podem ser utilizados em dispositivos de entrega, tais como meias e luvas para tratamento de neuropatia periférica. Também foi produzido uma formulação para uso tópico, um gel liberador de NO, sendo um veículo de entrega, com ação bactericida contra *S. epidermidis* ATCC 35984. Além disso, já é evidenciado a atividade vasodilatadora das MPSi-NP e da ação anti-inflamatória do óxido nítrico, indicado o uso de formulações tópicas de MPSi-NP para tratamento de feridas e edemas, com ação anti-inflamatória, antibacteriana e vasodilatadora. Assim, os resultados até aqui obtidos demonstram a necessidade de estudos mais detalhados e avançados para essas aplicações, que se mostram bastante promissoras

## 7 CONCLUSÃO GERAL

Esta tese teve o intuito de avaliar diferentes aplicações para a nanoplateforma liberadora de óxido nítrico, MPSi-NP. Com todos os resultados obtidos foi possível constatado

a eficiente liberação de óxido nítrico pelas MPSi-NP, além do material reduzir drasticamente a quantidade de cianeto livre, resultando em um material com baixa citotoxicidade em relação ao nitroprussiato livre (SNP). As MPSi-NP apresentaram atividade vasodilatadora, sugerindo que seu uso em tratamentos de emergência hipertensivos, angina, hipertensão pulmonar são promissores. Além disso, a nanoplataforma MPSi-NP exibiu, em testes de ação antibacteriana, uma diminuição significativa no número de células bacterianas viáveis no biofilme (mais de 600 vezes para *Staphylococcus aureus* ATCC 700698 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984). A combinação das MPSi-NP com ampicilina e tetraciclina promoveu uma diminuição significativa na CIM para cepas resistentes de *S. aureus* ATCC 700698 (2 vezes) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (4 vezes). Resultados obtidos nessa tese também sugerem que o uso tópico de MPSi-NP em combinação com antibióticos pode ser uma estratégia para prevenir e, eventualmente, tratar infecções bacterianas resistentes. Ensaio com MPSi-NP em gel ou sobre fibras de algodão demonstraram liberação de NO em condições ambientes, sinalizando para seu potencial para uso em formulações e dispositivos tópicos para tratamentos de neuropatias periférica, infecções bacterianas, tratamento de edemas etc.

**REFERÊNCIAS**

- 1 LIN, Hong-Ping; MOU, Chung-Yuan. Structural and Morphological Control of Cationic Surfactant-Templated Mesoporous Silica. **Accounts Of Chemical Research**, [S.L.], v. 35, n. 11, p. 927-935, 16 ago. 2002
- 2 WU, Si-Han; MOU, Chung-Yuan; LIN, Hong-Ping. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 3862, 2013.
- 3 TANG, Fangqiong; LI, Linlin; CHEN, Dong. Mesoporous Silica Nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. **Advanced Materials**, [S.L.], v. 24, n. 12, p. 1504-1534, 29 fev. 2012.
- 4 CARVALHO, Gabriela Corrêa; SÁBIO, Rafael Miguel; RIBEIRO, Tais de Cássia; MONTEIRO, Andreia Sofia; PEREIRA, Daniela Vassalo; RIBEIRO, Sidney José Lima; CHORILLI, Marlus. Highlights in Mesoporous Silica Nanoparticles as a Multifunctional Controlled Drug Delivery Nanoplatform for Infectious Diseases Treatment. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 0-30, 7 set. 2020.
- 5 OKAMOTO, Go; OKURA, Takeshi; GOTO, Katsumi. Properties of silica in water. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, [S.L.], v. 12, n. 1-2, p. 123-132, jan. 1957.
- 6 PARMENTER, Kelly e; MILSTEIN, Frederick. Mechanical properties of silica aerogels. **Journal Of Non-Crystalline Solids**, [S.L.], v. 223, n. 3, p. 179-189, jan. 1998.
- 7 KESKAR, Nitin R.; CHELIKOWSKY, James R.. Structural properties of nine silica polymorphs. **Physical Review B**, [S.L.], v. 46, n. 1, p.1-13, 1 jul. 1992.
- 8 OTSUBO, Yasufumi; SEKINE, Masahiro; KATAYAMA, Shingo. Electrorheological properties of silica suspensions. **Journal Of Rheology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 479-496, abr. 1992.
- 9 BADLEY, Rickey D.; FORD, Warren T.; MCENROE, Frank J.; ASSINK, Roger A.. Surface modification of colloidal silica. **Langmuir**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 792-801, abr. 1990.
- 10 JAL, P. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. **Talanta**, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 1005-1028, abr. 2004.

- 11 VRANCKEN, K.C; POSSEMIERS, K; VOORT, P van Der; VANSANT, E.F. Surface modification of silica gels with aminoorganosilanes. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 235-241, maio 1995.
- 12 LIU, Xin; ZHU, Xudong; CAMARA, Mohamed Amara; QU, Qishu; SHAN, Yichu; YANG, Li. Surface modification with highly-homogeneous porous silica layer for enzyme immobilization in capillary enzyme microreactors. **Talanta**, [S.L.], v. 197, p. 539-547, maio 2019.
- 13 ZHAO, Bingxin; ZHANG, Xiaoli; BAI, Xue; YANG, Hongcheng; LI, Shang; HAO, Junjie; LIU, Haochen; LU, Rui; XU, Bing; WANG, Liduo. Surface modification toward luminescent and stable silica-coated quantum dots color filter. **Science China Materials**, [S.L.], v. 62, n. 10, p. 1463-1469, 22 maio 2019.
- 14 ASEFA, Tewodros; TAO, Zhimin. Mesoporous silica and organosilica materials — Review of their synthesis and organic functionalization. **Canadian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 90, n. 12, p. 1015-1031, dez. 2012.
- 15 LIN, Yu-Shen; HAYNES, Christy L.. Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 132, n. 13, p. 4834-4842, 15 mar. 2010.
- 16 MOKAYA, Robert. Observation of some pore wall ordering in mesoporous silica. **Chemical Communications**, [S.L.], n. 12, p. 1092-1093, 2001.
- 17 SALMAN, Muhammad; JAHAN, Shanaz; KANWAL, Shamsa; MANSOOR, Farrukh. Recent advances in the application of silica nanostructures for highly improved water treatment: a review. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 21, p. 21065-21084, 23 maio 2019.
- 18 GAMA, Mariana Roberto; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan. Nanomaterials in Liquid Chromatography: recent advances in stationary phases. **Nanomaterials In Chromatography**, [S.L.], p. 255-297, 2018.
- 19 WALCARIUS, Alain. Silica-based electrochemical sensors and biosensors: recent trends. **Current Opinion In Electrochemistry**, [S.L.], v. 10, p. 88-97, ago. 2018.
- 20 LIANG, Jie; LIANG, Zibin; ZOU, Ruqiang; ZHAO, Yanli. Heterogeneous Catalysis in Zeolites, Mesoporous Silica, and Metal-Organic Frameworks. **Advanced Materials**, [S.L.], v. 29, n. 30, p. 1701139, 19 jun. 2017.

- 21 FALCÓN, J.M.; OTUBO, L.M.; AOKI, I.V.. Highly ordered mesoporous silica loaded with dodecylamine for smart anticorrosion coatings. **Surface And Coatings Technology**, [S.L.], v. 303, p. 319-329, out. 2016.
- 22 MANZANO, Miguel; VALLET-REGÍ, María. Mesoporous silica nanoparticles in nanomedicine applications. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 1-14, maio 2018.
- 23 CHA, Bong Geun; KIM, Jaeyun. Functional mesoporous silica nanoparticles for bio-imaging applications. **Wires Nanomedicine And Nanobiotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-14, 22 mar. 2018.
- 24 KONG, Chee Hoe; STEFFI, Chris; SHI, Zhilong; WANG, Wilson. Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [S.L.], v. 106, n. 8, p. 2878-2887, 2 maio 2018.
- 25 LI, Zhe; ZHANG, Yongtai; FENG, Nianping. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 219-237, 7 fev. 2019.
- 26 WANG, Ying; ZHAO, QinFu; HAN, Ning; BAI, Ling; LI, Jia; LIU, Jia; CHE, Erxi; HU, Liang; ZHANG, Qiang; JIANG, Tongying. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 313-327, fev. 2015.
- 27 Food and Drug Administration (FDA), CFR Code of Federal Regulations Title 21 The information on this page is current as of April 1 2016.
- 28 K. Roy, US Food and Drug Administration GRAS Substances (SCOGS) Database— Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Silicates, Available Online:  
<https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/gras/scogs/ucm260849.htm>. (n.d.).
- 29 TANG, Fangqiong; LI, Linlin; CHEN, Dong. Mesoporous Silica Nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. **Advanced Materials**, [S.L.], v. 24, n. 12, p. 1504-1534, 29 fev. 2012.
- 30 HASTINGS, Garth W.. **Macromolecular Biomaterials**. S.L: Taylor And Francis Group, 2017.

- 31 CLAYBAUGH, Taylor; DECKER, Sarah; MCCALL, Kelly; SLYVKA, Yuriy; STEIMLE, Jerrod; WOOD, Aaron; SCHAEFER, Megan; THUMA, Jean; INMAN, Sharon. L-Arginine Supplementation in Type II Diabetic Rats Preserves Renal Function and Improves Insulin Sensitivity by Altering the Nitric Oxide Pathway. **International Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 2014, p. 1-7, 2014.
- 32 WIMALAWANSA, Sunil J. Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 1935-1954, 16 jul. 2008.
- 33 FRANCIS, Sharron H.; BUSCH, Jennifer L.; CORBIN, Jackie D.. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 525-563, 17 ago. 2010.
- 34 CARVAJAL, Jorge A.; GERMAIN, Alfredo M.; HUIDOBRO-TORO, Juan Pablo; WEINER, Carl P.. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 184, n. 3, p. 409-420, 2000.
- 35 FREEDMAN, J e; LOSCALZO, J; BARNARD, M R; ALPERT, C; KEANEY, J F; MICHELSON, A D. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 100, n. 2, p. 350-356, 15 jul. 1999.
- 36 SRIVASTAVA, Sudha; DESAI, Prashant; COUTINHO, Evans; GOVIL, Girjesh. Mechanism of Action of L-arginine on the Vitality of Spermatozoa is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 954-958, 1 maio 2006.
- 37 SATO, Kazuya; OZAKI, Katsutoshi; OH, Iekuni; MEGURO, Akiko; HATANAKA, Keiko; NAGAI, Tadashi; MUROI, Kazuo; OZAWA, Keiya. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 228-234, 19 set. 2006.
- 38 GRAZIEWICZ, Maria; WINK, David A.; LAVAL, Françoise. Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for no-mediated dna damage. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 2501-2505, 1996.
- 39 ENINNO, Michael P.. Future directions in phosphodiesterase drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 22, n. 22, p. 6794-6800, nov. 2012.

- 40 LEVINE, Arlene Bradley; PUNIHAOLE, David; LEVINE, T. Barry. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. **Cardiology**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 55-68, 2012.
- 41 HETRICK, Evan M.; SHIN, Jae Ho; PAUL, Heather S.; SCHOENFISCH, Mark H.. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. **Biomaterials**, [S.L.], v. 30, n. 14, p. 2782-2789, maio 2009
- 42 KAFSHGARI, M. Hasanzadeh; DELALAT, B.; HARDING, F. J.; CAVALLARO, A.; MÄKILÄ, E.; SALONEN, J.; VASILEV, K.; VOELCKER, N. H.. Antibacterial properties of nitric oxide-releasing porous silicon nanoparticles. **Journal Of Materials Chemistry B**, [S.L.], v. 4, n. 11, p. 2051-2058, 2016.
- 43 LU, Yuan; SLOMBERG, Danielle L.; SUN, Bin; SCHOENFISCH, Mark H.. Shape- and Nitric Oxide Flux-Dependent Bactericidal Activity of Nitric Oxide-Releasing Silica Nanorods. **Small**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 2189-2198, 30 jan. 2013.
- 44 CARPENTER, Alexis W.; WORLEY, Brittany V.; SLOMBERG, Danielle L.; SCHOENFISCH, Mark H.. Dual Action Antimicrobials: nitric oxide release from quaternary ammonium-functionalized silica nanoparticles. **Biomacromolecules**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 3334-3342, 21 set. 2012.
- 45 KAFSHGARI, Morteza Hasanzadeh; CAVALLARO, Alex; DELALAT, Bahman; HARDING, Frances J; MCINNES, Steven Jp; MÄKILÄ, Ermei; SALONEN, Jarno; VASILEV, Krasimir; VOELCKER, Nicolas H. Nitric oxide-releasing porous silicon nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-9, 4 jul. 2014.
- 46 RICCIO, Daniel A.; NUGENT, Julia L.; SCHOENFISCH, Mark H.. Stöber Synthesis of Nitric Oxide-Releasing S-Nitrosothiol-Modified Silica Particles. **Chemistry Of Materials**, [S.L.], v. 23, n. 7, p. 1727-1735, 7 mar. 2011.
- 47 FAN, Haitao; LEI, Zhibin; PAN, Jia Hong; ZHAO, X.s.. Sol-gel synthesis, microstructure and adsorption properties of hollow silica spheres. **Materials Letters**, [S.L.], v. 65, n. 12, p. 1811-1814, jun. 2011.
- 48 SILVA FILHO, Pedro M.; PAZ, Iury A.; NASCIMENTO, Nilberto R. F.; SANTOS, Cláudia F.; ARAËJO, Valdevane R.; AQUINO, Camila P.; RIBEIRO, T. S.; VASCONCELOS, Igor F.; LOPES, Luiz G. F.; SOUSA, Eduardo H. S.. Incorporation of Nitroprusside on Silica Nanoparticles—A Strategy for Safer Use of This NO Donor in Therapy. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 2912-2921, 13 maio 2019.

- 49 KEEFER, Larry K.; FLIPPEN-ANDERSON, Judith L.; GEORGE, Clifford; SHANKLIN, Anna P.; DUNAMS, Tandra M.; CHRISTODOULOU, Danae; SAAVEDRA, Joseph E.; SAGAN, Elizabeth S.; BOHLE, D.Scott. Chemistry of the Diazeniumdiolates I. Structural and Spectral Characteristics of the [N(O)NO]-Functional Group. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 377-394, ago. 2001.
- 50 CARPENTER, Alexis W.; REIGHARD, Katelyn P.; SAAVEDRA, Joseph E.; SCHOENFISCH, Mark H.. O<sub>2</sub>-Protected diazeniumdiolate-modified silica nanoparticles for extended nitric oxide release from dental composites. **Biomaterials Science**, [S.L.], v. 1, n. 5, p. 456, 2013.
- 51 DAVIES, Keith M.; WINK, David A.; SAAVEDRA, Joseph E.; KEEFER, Larry K.. Chemistry of the Diazeniumdiolates. 2. Kinetics and Mechanism of Dissociation to Nitric Oxide in Aqueous Solution. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 123, n. 23, p. 5473-5481, 19 abr. 2001.
- 52 SHIN, Jae Ho; SCHOENFISCH, Mark H.. Inorganic/Organic Hybrid Silica Nanoparticles as a Nitric Oxide Delivery Scaffold. **Chemistry Of Materials**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 239-249, 11 dez. 2007.
- 53 SHIN, Jae Ho; METZGER, Sara K.; SCHOENFISCH, Mark H.. Synthesis of Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticles. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 129, n. 15, p. 4612-4619, 22 mar. 2007.
- 54 ZHANG, Huiping; ANNICH, Gail M.; MISKULIN, Judiann; STANKIEWICZ, Kelly; OSTERHOLZER, Kathryn; MERZ, Scott I.; BARTLETT, Robert H.; MEYERHOFF, Mark E.. Nitric Oxide-Releasing Fumed Silica Particles: •• synthesis, characterization, and biomedical application. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 125, n. 17, p. 5015-5024, 1 abr. 2003
- 55 CARPENTER, Alexis W.; WORLEY, Brittany V.; SLOMBERG, Danielle L.; SCHOENFISCH, Mark H.. Dual Action Antimicrobials: nitric oxide release from quaternary ammonium-functionalized silica nanoparticles. **Biomacromolecules**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 3334-3342, 21 set. 2012.
- 56 CHAKRAPANI, Harinath; SHOWALTER, Brett M.; CITRO, Michael L.; KEEFER, Larry K.; SAAVEDRA, Joseph E.. Nitric Oxide Prodrugs: •• diazeniumdiolate anions of hindered secondary amines. **Organic Letters**, [S.L.], v. 9, n. 22, p. 4551-4554, 1 out. 2007.

- 57 KEEFER, Larry K.. Fifty Years of Diazeniumdiolate Research. From Laboratory Curiosity to Broad-Spectrum Biomedical Advances. **Acs Chemical Biology**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 1147-1155, 30 set. 2011.
- 58 FERRO, A.. S-Nitrosothiols as Nitric Oxide-Donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 20, p. 2679-2690, 1 out. 2004.
- 59 CHOU, Hung-Chang; CHIU, Shih-Jiuan; LIU, Ying-Ling; HU, Teh-Min. Direct Formation of S-Nitroso Silica Nanoparticles from a Single Silica Source. **Langmuir**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 812-822, 16 jan. 2014.
- 60 LIN, Shu-Yi; WANG, Meng-Ren; CHIU, Shih-Jiuan; LIN, Chien-Yu; HU, Teh-Min. S-Nitrosothiols (SNO) as light-responsive molecular activators for post-synthesis fluorescence augmentation in fluorophore-loaded nanospheres. **Journal Of Materials Chemistry B**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 153-164, 2018.
- 61 FAN, Wenpei; LU, Nan; HUANG, Peng; LIU, Yi; YANG, Zhen; WANG, Sheng; YU, Guocan; LIU, Yijing; HU, Junkai; HE, Qianjun. Glucose-Responsive Sequential Generation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide for Synergistic Cancer Starving-Like/Gas Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 56, n. 5, p. 1229-1233, 9 dez. 2016.
- 62 AFONSO, Damien; VALETTI, Sabrina; FRAIX, Aurore; BASCETTA, Claudia; PETRALIA, Salvatore; CONOCI, Sabrina; FEILER, Adam; SORTINO, Salvatore. Multivalent mesoporous silica nanoparticles photo-delivering nitric oxide with carbon dots as fluorescence reporters. **Nanoscale**, [S.L.], v. 9, n. 36, p. 13404-13408, 2017.
- 63 SILVA, Francisco O.N. da; GOMES, Elis C.C.; FRANCISCO, Thiago dos S.; HOLANDA, Alda K.M.; DIÓGENES, Izaura C.N.; SOUSA, Eduardo H.s. de; LOPES, Luiz G.F.; LONGHINOTTI, Elisane. NO donors cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(L)NO]<sup>3+</sup> and [Fe(CN)<sub>4</sub>(L)NO]<sup>-</sup> complexes immobilized on modified mesoporous silica spheres. **Polyhedron**, [S.L.], v. 29, n. 18, p. 3349-3354, dez. 2010.
- 64 FAROOQ, Asima; TOSHEVA, Lubomira; AZZAWI, May; WHITEHEAD, Debra. Real-time observation of aortic vessel dilation through delivery of sodium nitroprusside via slow release mesoporous nanoparticles. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 478, p. 127-135, set. 2016.
- 65 HU, Chunchun; SUN, Jianguo; ZHANG, Yu; CHEN, Jian; LEI, Yuan; SUN, Xinghuai; DENG, Yonghui. Local Delivery and Sustained-Release of Nitric Oxide

- Donor Loaded in Mesoporous Silica Particles for Efficient Treatment of Primary Open-Angle Glaucoma. **Advanced Healthcare Materials**, [S.L.], v. 7, n. 23, p. 1801047, 2 nov. 2018.
- 66 DORO, Fabio Gorzoni; RODRIGUES-FILHO, Ubirajara P.; TFOUNI, E.. A regenerable ruthenium tetraammine nitrosyl complex immobilized on a modified silica gel surface: preparation and studies of nitric oxide release and nitrite-to-no conversion. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 307, n. 2, p. 405-417, mar. 2007
- 67 MARTINEZ, Luis R.; HAN, George; CHACKO, Manju; MIHU, Mircea Radu; JACOBSON, Marc; GIALANELLA, Phil; FRIEDMAN, Adam J.; NOSANCHUK, Joshua D.; FRIEDMAN, Joel M.. Antimicrobial and Healing Efficacy of Sustained Release Nitric Oxide Nanoparticles Against Staphylococcus Aureus Skin Infection. **Journal Of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 129, n. 10, p. 2463-2469, out. 2009.
- 68 CONESKI, Peter N.; SCHOENFISCH, Mark H.. Nitric oxide release: part iii. measurement and reporting. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 41, n. 10, p. 3753, 2012
- 69 DUBEY, Megha; NAGARKOTI, Sheela; AWASTHI, Deepika; SINGH, Abhishek K; CHANDRA, Tulika; KUMARAVELU, J; BARTH WAL, Manoj K; DIKSHIT, Madhu. Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 1-12, set. 2016.
- 70 A COLELL,.; GREEN, D R; RICCI, J-E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 1573-1581, 25 set. 2009.
- 71 HARA, Makoto R.; SNYDER, Solomon H.. Nitric Oxide–GAPDH–Siah: a novel cell death cascade. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 26, n. 4-6, p. 525-536, 22 abr. 2006.
- 72 STEVENS, Ellen V.; CARPENTER, Alexis W.; SHIN, Jae Ho; LIU, Jinsong; DER, Channing J.; SCHOENFISCH, Mark H.. Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticle Inhibition of Ovarian Cancer Cell Growth. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 775-785, 1 abr. 2010.

- 73 BELANI, Kumarg; HOTTINGER, Danielg; BEEBE, Davids; KOZHIMANNIL, Thomas; PRIELIPP, Richardc. Sodium nitroprusside in 2014: a clinical concepts review. **Journal Of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 462, 2014.
- 74 SZACHOWSKI, Konrad; WANAT, Alicja; BARBIERI, Andrea; WASIELEWSKA, Ewa; WITKO, Małgorzata; STOCHEL, Grażyna; STASICKA, Zofia. Reactions of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]_2^-$  complex with biologically relevant thiols. **New J. Chem.**, [S.L.], v. 26, n. 10, p. 1495-1502, 2002.
- 75 TINKER, J H. Sodium nitroprusside: pharmacology, toxicology and therapeutics. **Anesthesiology**, [S.L.], p. 340-354, 1976.
- 76 CAMPBELL, Jacqueline M.; MCCRAE, Fiona; REGLINSKI, John; WILSON, Rhoda; SMITH, W.Ewen; STURROCK, Roger D.. The interaction of sodium nitroprusside with peripheral white blood cells in vitro: a rationale for cyanide release in vivo. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 1156, n. 3, p. 327-333, mar. 1993.
- 77 KRUSZYNA, Roger P. Smitroger P. Smith: Harriet. Nitroprusside produces cyanide poisoning via reaction with hemoglobin. **J Pharmacol Exp Ther**, [s. l], p. 1-14, 1 dez. 1974
- 78 MOELLER, Therald.. Inorganic nitrosyl compounds. II. Coordination compounds. **Journal Of Chemical Education**, [S.L.], v. 23, n. 11, p. 542, nov. 1946.
- 79 FORD, P.C.; BOURASSA, J.; MIRANDA, K.; LEE, B.; LORKOVIC, I.; BOGGS, S.; KUDO, S.; LAVERMAN, L.. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coordination Chemistry Reviews**, [S.L.], v. 171, p. 185-202, abr. 1998.
- 80 GLUSA, Erika; MARKWARDT, F.; STÜRZEBECKER, J.. Effects of Sodium Nitroprusside and Other Pentacyanonitrosyl Complexes on Platelet Aggregation. **Pathophysiology Of Haemostasis And Thrombosis**, [S.L.], v. 3, n. 5-6, p. 249-256, 1974.
- 81 KRUSZYNA, Harriet; KRUSZYNA, Robert; HURST, Jeffrey; SMITH, Roger P.. Toxicology and pharmacology of some ruthenium compounds: vascular smooth muscle relaxation by nitrosyl derivatives of ruthenium and iridium. **Journal Of Toxicology And Environmental Health**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 757-773, jul. 1980.

- 82 JOANNOU, Christopher L.; CUI, Xiao-Yuan; ROGERS, Nicola; VIELOTTE, Natasha; MARTINEZ, Claudia L. Torres; VUGMAN, Ney V.; HUGHES, Martin N.; CAMMACK, Richard. Characterization of the Bactericidal Effects of Sodium Nitroprusside and Other Pentacyanonitrosyl Complexes on the Food Spoilage Bacterium *Clostridium sporogenes*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 64, n. 9, p. 3195-3201, set. 1998.
- 83 MARCONDES, Fabiana G.; FERRO, Alessandro A.; SOUZA-TORSONI, Adriana; SUMITANI, Marie; CLARKE, Michael J.; FRANCO, Douglas W.; TFOUNI, Elia; KRIEGER, Marta H.. In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. **Life Sciences**, [S.L.], v. 70, n. 23, p. 2735-2752, abr. 2002.
- 84 TORSONI, Adriana Souza; BARROS, Brígida Figueiredo de; TOLEDO, José Carlos; HAUN, Marcela; KRIEGER, Marta Helena; TFOUNI, Elia; FRANCO, Douglas Wagner. Hypotensive Properties and Acute Toxicity of trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>P(OEt)<sub>3</sub>(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, a New Nitric Oxide Donor. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 247-254, maio 2002.
- 85 CERQUEIRA, Joao B. G.; SILVA, Lucio F. G.; LOPES, Luis G. F.; MORAES, Maria E. A.; NASCIMENTO, Nilberto R. F.. Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by new nitric oxide donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex. **International Braz J Urol**, [S.L.], v. 34, n. 5, p. 638-647, out. 2008
- 86 SILVA, Jean Jerley N.; PAVANELLI, Wander R.; PEREIRA, José Clayston M.; SILVA, João S.; FRANCO, Douglas W.. Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection Using Ruthenium Nitric Oxide Donors. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 53, n. 10, p. 4414-4421, out. 2009.
- 87 STAURENGO-FERRARI, Larissa; MIZOKAMI, Sandra S.; SILVA, Jean J.; SILVA, Francisco O.N. da; SOUSA, Eduardo H.s.; FRANÇA, Luiz G. da; MATUOKA, Mariana L.; GEORGETTI, Sandra R.; BARACAT, Marcela M.; CASAGRANDE, Rubia. The ruthenium NO donor, [Ru(bpy)<sub>2</sub>(NO)SO<sub>3</sub>](PF<sub>6</sub>), inhibits inflammatory pain: involvement of trpv1 and cgmp/pkg/atp-sensitive potassium channel signaling pathway. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [S.L.], v. 105, p. 157-165, abr. 2013

- 88 FORD, P.C.; BOURASSA, J.; MIRANDA, K.; LEE, B.; LORKOVIC, I.; BOGGS, S.; KUDO, S.; LAVERMAN, L.. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coordination Chemistry Reviews**, [S.L.], v. 171, p. 185-202, abr. 1998.
- 89 CÂNDIDO, Manuela C. L.; OLIVEIRA, Arquimedes M.; SILVA, Francisco O. N.; HOLANDA, Alda K. M.; PEREIRA, Walysson Gomes; SOUSA, Eduardo H. S.; CARNEIRO, Zumira A.; SILVA, Roberto S.; LOPES, Luiz G. F.. Photochemical and Electrochemical Study of the Release of Nitric Oxide from [Ru(bpy)<sub>2</sub>L(NO)](PF<sub>6</sub>)<sup>n</sup>Complexes (L = Imidazole, 1-Methylimidazole, Sulfite and Thiourea), Toward the Development of Therapeutic Photodynamic Agents. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 1-12, 2015.
- 90 LEITÃO JUNIOR, A s; CAMPOS, R M; CERQUEIRA, J B G; FONTELES, M C; SANTOS, C F; NUCCI, G de; SOUSA, E H s; LOPES, L G F; GONZAGA-SILVA, L F; NASCIMENTO, N R F. Relaxant effect of a metal-based drug in human corpora cavernosa and its mechanism of action. **International Journal Of Impotence Research**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 20-24, 29 out. 2015
- 91 NASCIMENTO, Nilberto Robson Falcão do; AGUIAR, Francisco Léo Nascimento de; SANTOS, Cláudia Ferreira; COSTA, Angélica Maria Luna; HARDOIM, Daiana de Jesus; CALABRESE, Kátia da Silva; ALMEIDA-SOUZA, Fernando; SOUSA, Eduardo Henrique Silva de; LOPES, Luiz Gonzaga de França; TEIXEIRA, Maria Jania. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 192, p. 61-65, abr. 2019
- 92 CARVALHO, Edinilton Muniz; RIDNOUR, Lisa A.; GOUVEIA JÚNIOR, Florêncio Sousa; CABRAL, Pedro Henrique Bezerra; NASCIMENTO, Nilberto Robson Falcão do; WINK, David A.; FRANCO, Douglas W.; MEDEIROS, Mayara Jane Campos de; PONTES, Daniel de Lima; LONGHINOTTI, Elisane. A divergent mode of activation of a nitrosyl iron complex with unusual antiangiogenic activity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [S.L.], v. 210, p. 111133, set. 2020.
- 93 COSTA, Paula Priscila Correia; WALLER, Stefanie Bressan; SANTOS, Gilvan Ribeiro dos; GONDIM, Fladimir de Lima; SERRA, Daniel Silveira; CAVALCANTE, Francisco Sales Ávila; GOUVEIA JÚNIOR, Florêncio Sousa; PAULA JÚNIOR, Valdir Ferreira de; SOUSA, Eduardo Henrique Silva; LOPES,

- Luiz Gonzaga de França. Anti-asthmatic effect of nitric oxide metallo-donor FOR811A [cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(2-MIM)(NO)](PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>] in the respiratory mechanics of Swiss mice. **Plos One**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 1-14, 12 mar. 2021.
- 94 SILVA FILHO, Pedro M.; PAZ, Iury A.; NASCIMENTO, Nilberto R. F.; SANTOS, Cláudia F.; ARAËJO, Valdevane R.; AQUINO, Camila P.; RIBEIRO, T. S.; VASCONCELOS, Igor F.; LOPES, Luiz G. F.; SOUSA, Eduardo H. S.. Incorporation of Nitroprusside on Silica Nanoparticles—A Strategy for Safer Use of This NO Donor in Therapy. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 2912-2921, 13 maio 2019.
- 95 FENG, Tao; WAN, Jingyuan; LI, Pan; RAN, Haitao; CHEN, Huali; WANG, Zhigang; ZHANG, Liangke. A novel NIR-controlled NO release of sodium nitroprusside-doped Prussian blue nanoparticle for synergistic tumor treatment. **Biomaterials**, [S.L.], v. 214, p. 119213, set. 2019.
- 96 HU, Chunchun; SUN, Jianguo; ZHANG, Yu; CHEN, Jian; LEI, Yuan; SUN, Xinghuai; DENG, Yonghui. Local Delivery and Sustained-Release of Nitric Oxide Donor Loaded in Mesoporous Silica Particles for Efficient Treatment of Primary Open-Angle Glaucoma. **Advanced Healthcare Materials**, [S.L.], v. 7, n. 23, p. 1801047, 2 nov. 2018.
- 97 HU, Chunchun; ZHANG, Yu; SONG, Maomao; DENG, Yonghui; SUN, Xinghuai; LEI, Yuan. Prolonged use of nitric oxide donor sodium nitroprusside induces ocular hypertension in mice. **Experimental Eye Research**, [S.L.], v. 202, p. 108280, jan. 2021
- 98 SILVA FILHO, Pedro Martins da; ANDRADE, Alexandre Lopes; LOPES, Jessica Barros Arrais Cruz; PINHEIRO, Aryane de Azevedo; VASCONCELOS, Mayron Alves de; FONSECA, Said Gonçalves da Cruz; LOPES, Luiz Gonzaga de França; SOUSA, Eduardo Henrique Silva; TEIXEIRA, Edson Holanda; LONGHINOTTI, Elisane. The biofilm inhibition activity of a NO donor nanosilica with enhanced antibiotics action. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 610, p. 121220, dez. 2021.
- 99 FAROOQ, Asima; TOSHEVA, Lubomira; AZZAWI, May; WHITEHEAD, Debra. Real-time observation of aortic vessel dilation through delivery of sodium nitroprusside via slow release mesoporous nanoparticles. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 478, p. 127-135, set. 2016.

- 100 FAROOQ, Asima; SHUKUR, Ali; ASTLEY, Cai; TOSHEVA, Lubomira; KELLY, Peter; WHITEHEAD, Debra; AZZAWI, May. Titania coating of mesoporous silica nanoparticles for improved biocompatibility and drug release within blood vessels. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 76, p. 208-216, ago. 2018
- 101 BRUNAUER, Stephen; EMMETT, P. H.; TELLER, Edward. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 60, n. 2, p. 309-319, fev. 1938.
- 102 SILVA FILHO, Pedro Martins da. Síntese de nanopartículas de sílicas carregadas positivamente e estudo de adsorção de fármacos aniônicos. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- 103 Vansant, **Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface**, Elsevier Science, 1995
- 104 OKABAYASHI, H.; SHIMIZU, I.; NISHIO, E.; CONNOR, C. J. O'. Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectral study of the interaction of 3-aminopropyltriethoxysilane on silica gel. Behavior of amino groups on the surface. **Colloid & Polymer Science**, [S.L.], v. 275, n. 8, p. 744-753, ago. 1997.
- 105 SHISHIDO, Silvia Mika; OLIVEIRA, Marcelo Ganzarolli de. Photosensitivity of Aqueous Sodium Nitroprusside Solutions: nitric oxide release versus cyanide toxicity. **Progress In Reaction Kinetics And Mechanism**, [S.L.], v. 26, n. 2-3, p. 239-261, jun. 2001.
- 106 GOEL, P. S.; GARG, A. N.. Moessbauer spectroscopic studies of the alkali metal and transition metal nitroprussides. **Inorganic Chemistry**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1344-1347, jul. 1971.
- 107 RASMUSSEN, Paul G.; MEYERS, E.A.. An investigation of Prussian Blue analogues by Mössbauer spectroscopy and magnetic susceptibility. **Polyhedron**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 183-190, jan. 1984.
- 108 YANG, Yongsheng; BROWNELL, Charles; SADRIEH, Nakissa; MAY, Joan; GROSSO, Alfred del; PLACE, David; LEUTZINGER, Eldon; DUFFY, Eric; HE, Ruyi; HOUN, Florence. Quantitative measurement of cyanide released from Prussian Blue. **Clinical Toxicology**, [S.L.], v. 45, n. 7, p. 776-781, jan. 2007
- 109 OSIRY, H.; CANO, A.; REGUERA, L.; LEMUS-SANTANA, A.A.; REGUERA, E.. Mercury (I) nitroprusside: a 2d structure supported on homometallic interactions. **Journal Of Solid State Chemistry**, [S.L.], v. 221, p. 79-84, jan. 2015.

- 110 GOMEZ, A.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, J.; REGUERA, E.. Unique coordination in metal nitroprussides: the structure of  $\text{Cu}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{Cu}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ . **Journal Of Chemical Crystallography**, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 893-903, dez. 2004.
- 111 Parwate, Mossbauer & Infrared Spectroscopic Studies of Several Nitroprussides, **Indian Journal of Chemistry -Section A**, [S.L.], v. 25A, p.151-154, fev. 1986.
- 112 KOSLYK, Jessyca L.; DUCCI, Renata D.; NÓVAK, Edison M.; ZÉTOLA, Viviane F.; LANGE, Marcos C.. Sodium nitroprusside: low price and safe drug to control bp during thrombolysis in ais. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S.L.], v. 73, n. 9, p. 755-758, set. 2015.
- 113 MACHADO, Roberto F.; NERKAR, Medha-Vini Londhe; DWEIK, Raed A.; HAMMEL, Jeffrey; JANOCHA, Allison; PYLE, Jacqueline; LASKOWSKI, Daniel; JENNINGS, Constance; ARROLIGA, Alejandro C.; ERZURUM, Serpil C.. Nitric oxide and pulmonary arterial pressures in pulmonary hypertension. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 37, n. 7, p. 1010-1017, out. 2004.
- 114 JOURNOIS, Didier; POUARD, Philippe; MAURIAT, Philippe; MALHERE, Thierry; VOUHE, Pascal; SAFRAN, Denis. Inhaled nitric oxide as a therapy for pulmonary hypertension after operations for congenital heart defects. **The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery**, [S.L.], v. 107, n. 4, p. 1129-1135, abr. 1994.
- 115 KRAMER, Anders; MORTENSEN, Christian Schmidt; SCHULTZ, Jacob Gammelgaard; LYHNE, Mads Dam; ANDERSEN, Asger; NIELSEN-KUDSK, Jens Erik. Inhaled nitric oxide has pulmonary vasodilator efficacy both in the immediate and prolonged phase of acute pulmonary embolism. **European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 265-272, 14 jul. 2020
- 116 VONBANK, K. Controlled prospective randomised trial on the effects on pulmonary haemodynamics of the ambulatory long term use of nitric oxide and oxygen in patients with severe COPD. **Thorax**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 289-293, 1 abr. 200
- 117 DUPUY, P M; A SHORE, S; DRAZEN, J M; FROSTELL, C; A HILL, W; ZAPOL, W M. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 90, n. 2, p. 421-428, 1 ago. 1992.
- 118 KACMAREK, R M; RIPPLE, R; A COCKRILL, B; BLOCH, K J; ZAPOL, W M; JOHNSON, D C. Inhaled nitric oxide. A bronchodilator in mild asthmatics with

- methacholine-induced bronchospasm. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, [S.L.], v. 153, n. 1, p. 128-135, jan. 1996.
- 119 OELZE, Matthias; MOLLNAU, Hanke; HOFFMANN, Nina; WARNHOLTZ, Ascan; BODENSCHATZ, Martin; SMOLENSKI, Albert; WALTER, Ulrich; SKATCHKOV, Mikhail; MEINERTZ, Thomas; MÜNZEL, Thomas. Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Serine 239 Phosphorylation as a Sensitive Monitor of Defective Nitric Oxide/cGMP Signaling and Endothelial Dysfunction. **Circulation Research**, [S.L.], v. 87, n. 11, p. 999-1005, 24 nov. 2000
- 120 ICHINOSE, Fumito; ROBERTS, Jesse D.; ZAPOL, Warren M.. Inhaled Nitric Oxide. **Circulation**, [S.L.], v. 109, n. 25, p. 3106-3111, 29 jun. 2004.
- 121 SAMBROOK, Joseph. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. [S.L.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 2028 p.
- 122 IYENGAR, R; STUEHR, D J; A MARLETTA, M. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 84, n. 18, p. 6369-6373, set. 1987.
- 123 GUTIERREZ, Fredy Rs; MINEO, Tiago Wp; PAVANELLI, Wander R; GUEDES, Paulo Mm; SILVA, João s. The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 236-245, jul. 2009.
- 124 DOVERSPIKE, Joshua C.; ZHOU, Yang; WU, Jianfeng; TAN, Xiaojuan; XI, Chuanwu; MEYERHOFF, Mark E.. Nitric oxide releasing two-part creams containing S-nitrosoglutathione and zinc oxide for potential topical antimicrobial applications. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 90, p. 1-9, set. 2019.
- 125 BOCÉ, Mathilde; TASSÉ, Marine; MALLET-LADEIRA, Sonia; PILLET, Flavien; SILVA, Charlotte da; VICENDO, Patricia; LACROIX, Pascal G.; MALFANT, Isabelle; ROLS, Marie-Pierre. Effect of trans(NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)NO](PF6) ruthenium nitrosyl complex on methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-8, 19 mar. 2019
- 126 VOS, Theo; LIM, Stephen s; ABBAFATI, Cristiana; ABBAS, Kaja M; ABBASI, Mohammad; ABBASIFARD, Mitra; ABBASI-KANGEVARI, Mohsen; ABBASTABAR, Hedayat; ABD-ALLAH, Foad; ABDELALIM, Ahmed. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a

- systematic analysis for the global burden of disease study 2019. **The Lancet**, [S.L.], v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, out. 2020.
- 127 MURRAY, Christopher JI; IKUTA, Kevin Shunji; SHARARA, Fablina; SWETSCHINSKI, Lucien; AGUILAR, Gisela Robles; GRAY, Authia; HAN, Chieh; BISIGNANO, Catherine; RAO, Puja; WOOL, Eve. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [S.L.], v. 399, n. 10325, p. 629-655, fev. 2022.
- 128 MANDAKHALIKAR, Kedar Diwakar; RAHMAT, Juwita Norasmara; CHIONG, Edmund; NEOH, Koon Gee; SHEN, Liang; TAMBYAH, Paul Anantharajah. Extraction and quantification of biofilm bacteria: method optimized for urinary catheters. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-9, 23 maio 2018.
- 129 KANUGALA, Sirisha; JINKA, Sudhakar; PUVVADA, Nagaprasad; BANERJEE, Rajkumar; KUMAR, C. Ganesh. Phenazine-1-carboxamide functionalized mesoporous silica nanoparticles as antimicrobial coatings on silicone urethral catheters. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-16, 17 abr. 2019.
- 130 DORRESTEIJN, Kirsten R. I. S.; BROUWER, Matthijs C.; JELLEMA, Korné; BEEK, Diederik van de. Bacterial external ventricular catheter-associated infection. **Expert Review Of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 219-229, 29 jan. 2020
- 131 PANT, Jitendra; GOUDIE, Marcus J.; CHAJI, Sarah M.; JOHNSON, Benjamin W.; HANDA, Hitesh. Nitric oxide releasing vascular catheters for eradicating bacterial infection. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [S.L.], v. 106, n. 8, p. 2849-2857, 20 dez. 2017.
- 132 LIU, Niu; XU, Yueming; HOSSAIN, Sajjad; HUANG, Nick; COURSOLE, Dan; GRALNICK, Jeffrey A.; BOON, Elizabeth M.. Nitric Oxide Regulation of Cyclic di-GMP Synthesis and Hydrolysis in *Shewanella woodyi*. **Biochemistry**, [S.L.], v. 51, n. 10, p. 2087-2099, 5 mar. 2012.
- 133 MONROE, Don. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **Plos Biology**, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 1-4, 13 nov. 2007.
- 134 GALLAGHER, James J.; WILLIAMS-BOUYER, Natalie; VILLARREAL, Cynthia; HEGGERS, John P.; HERNDON, David N.. Treatment of infection in burns. **Total Burn Care**, [S.L.], p. 136-176, 2007.

- 135 BESSA, Lucinda J; FAZII, Paolo; GIULIO, Mara di; CELLINI, Luigina. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. **International Wound Journal**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 47-52, 24 fev. 2013.
- 136 MORAN, Gregory J.; KRISHNADASAN, Anusha; GORWITZ, Rachel J.; FOSHEIM, Gregory E.; MCDOUGAL, Linda K.; CAREY, Roberta B.; TALAN, David A.. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 355, n. 7, p. 666-674, 17 ago. 2006.
- 137 HERSH, Adam L.. National Trends in Ambulatory Visits and Antibiotic Prescribing for Skin and Soft-Tissue Infections. **Archives Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 168, n. 14, p. 1585, 28 jul. 2008.
- 138 IWAMOTO, Kazumasa; MORIWAKI, Masaya; MIYAKE, Ryu; HIDE, Michihiro. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: strain-specific cell wall proteins and skin immunity. **Allergology International**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 309-315, jul. 2019.
- 139 TOTTE, J.e.e.; FELTZ, W.T. van Der; HENNEKAM, M.; VAN BELKUM, A.; VAN ZUUREN, E.J.; PASMANS, S.G.M.A.. Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. **British Journal Of Dermatology**, [S.L.], v. 175, n. 4, p. 687-695, 5 jul. 2016.
- 140 GUZIK, T. J.; BZOWSKA, M.; KASPROWICZ, A.; CZERNIAWSKA-MYSIK, G.; WOJCIK, K.; SZMYD, D.; ADAMEK-GUZIK, T.; PRYJMA, J.. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. **Clinical**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 448-455, abr. 2005.
- 141 MCCANN, Maureen T.; GILMORE, Brendan F.; GORMAN, Sean P.. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 1551-1571, 1 dez. 2008.
- 142 NGUYEN, Thuan H.; PARK, Matthew D.; OTTO, Michael. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-7, 21 mar. 2017.
- 143 BACKLUND, Christopher J.; WORLEY, Brittany V.; SCHOENFISCH, Mark H.. Anti-biofilm action of nitric oxide-releasing alkyl-modified poly(amidoamine)

- dendrimers against *Streptococcus mutans*. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 29, p. 198-205, jan. 2016.
- 144 SLOMBERG, Danielle L.; LU, Yuan; BROADNAX, Angela D.; HUNTER, Rebecca A.; CARPENTER, Alexis W.; SCHOENFISCH, Mark H.. Role of Size and Shape on Biofilm Eradication for Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticles. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [S.L.], v. 5, n. 19, p. 9322-9329, 5 set. 2013.
- 145 BOCÉ, Mathilde; TASSÉ, Marine; MALLET-LADEIRA, Sonia; PILLET, Flavien; SILVA, Charlotte da; VICENDO, Patricia; LACROIX, Pascal G.; MALFANT, Isabelle; ROLS, Marie-Pierre. Effect of trans(NO, OH)-[RuFT(Cl)(OH)NO](PF<sub>6</sub>) ruthenium nitrosyl complex on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-8, 19 mar. 2019.
- 146 HOWLIN, Robert P.; CATHIE, Katrina; HALL-STOODLEY, Luanne; CORNELIUS, Victoria; DUGNAN, Caroline; ALLAN, Raymond N.; FERNANDEZ, Bernadette O.; BARRAUD, Nicolas; BRUCE, Ken D.; JEFFERIES, Johanna. Low-Dose Nitric Oxide as Targeted Anti-biofilm Adjunctive Therapy to Treat Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. **Molecular Therapy**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 2104-2116, set. 2017.
- 147 DOVERSPIKE, Joshua C.; MACK, Shale J.; LUO, Amy; STRINGER, Blake; RENO, Shelby; CORNELL, Marie S.; ROJAS-PENA, Alvaro; WU, Jianfeng; XI, Chuanwu; YEVLIN, Alexander. Nitric Oxide-Releasing Insert for Disinfecting the Hub Region of Tunnel Dialysis Catheters. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [S.L.], v. 12, n. 40, p. 44475-44484, 15 set. 2020.
- 148 ROSATO, Antonio; VITALI, Cesare; LAURENTIS, Nicolino de; ARMENISE, Domenico; MILILLO, Maria Antonietta. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 727-732, nov. 2007.
- 149 LECHARTIER, Benoit; HARTKOORN, Ruben C.; COLE, Stewart T.. In Vitro Combination Studies of Benzothiazinone Lead Compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 56, n. 11, p. 5790-5793, nov. 2012.
- 150 ANDRADE, Alexandre Lopes; VASCONCELOS, Mayron Alves de; ARRUDA, Francisco Vassiliepe de Sousa; NASCIMENTO NETO, Luiz Gonzaga do; CARVALHO, José Marcos da Silveira; GONDIM, Ana Claudia Silva; LOPES, Luiz

- Gonzaga de França; SOUSA, Eduardo Henrique Silva; TEIXEIRA, Edson Holanda. Antimicrobial activity and antibiotic synergy of a biphosphinic ruthenium complex against clinically relevant bacteria. **Biofouling**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 442-454, 20 abr. 2020.
- 151 NUNES, Edinaira Deodato; VILLELA, Anne Drumond; BASSO, Luiz Augusto; TEIXEIRA, Edson H.; ANDRADE, Alexandre L.; VASCONCELOS, Mayron A.; NASCIMENTO NETO, Luiz G. do; GONDIM, Ana C. S.; DIÓGENES, Izauro C. N.; ROMO, Adolfo I. B.. Light-induced disruption of an acyl hydrazone link as a novel strategy for drug release and activation: isoniazid as a proof-of-concept case. **Inorganic Chemistry Frontiers**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 859-870, 2020.
- 152 IKEDA, Shōji. In vitro cyanide release from sodium nitroprusside in various intravenous solutions. **Anesthesia & Analgesia**, [s. l], p. 381-385, abr. 1987.
- 153 ARNOLD, William P.; LONGNECKER, David E.; EPSTEIN, Robert M.. Photodegradation of Sodium Nitroprusside. **Anesthesiology**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 254-260, 1 set. 1984.
- 154 RONCAROLI, Federico; VAN ELDIK, Rudi; OLABE, José A.. Release of NO from Reduced Nitroprusside Ion. Iron-Dinitrosyl Formation and NO-Disproportionation Reactions. **Inorganic Chemistry**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 2781-2790, 16 mar. 2005.
- 155 FEY, Paul D; OLSON, Michael e. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 917-933, jun. 2010.
- 156 DOVERSPIKE, Joshua C.; ZHOU, Yang; WU, Jianfeng; TAN, Xiaojuan; XI, Chuanwu; MEYERHOFF, Mark E.. Nitric oxide releasing two-part creams containing S-nitrosoglutathione and zinc oxide for potential topical antimicrobial applications. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 90, p. 1-9, set. 2019.
- 157 MUKHERJEE, Paramita; CINELLI, Maris A.; KANG, Soosung; SILVERMAN, Richard B.. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. **Chem. Soc. Rev.**, [S.L.], v. 43, n. 19, p. 6814-6838, 19 fev. 2014.
- 158 CURY, Yara; PICCOLO, Gisele; GUTIERREZ, Vanessa Pacciari; FERREIRA, Sergio Henrique. Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 243-254, out. 2011.

- 158 GALDINO, Giovane S.; CORTES, Steyner F.; DUARTE, Igor D.G.; PEREZ, Andrea C.. Involvement of the nitric oxide/CGMP/KATP pathway in antinociception induced by exercise in rats. **Life Sciences**, [S.L.], v. 86, n. 13-14, p. 505-509, mar. 2010.
- 160 SOUSA, Angela M.; PRADO, Wiliam A.. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, [S.L.], v. 897, n. 1-2, p. 9-19, abr. 2001.
- 161 HAMZA, May; WANG, Xiao-Min; WU, Tongtong; BRAHIM, Jaime s; ROWAN, Janet s; A DIONNE, Raymond. Nitric Oxide is Negatively Correlated to Pain during Acute Inflammation. **Molecular Pain**, [S.L.], v. 6, p. 1744-8069, 1 jan. 2010.
- 162 SOARES, Adriana C; LEITE, Rômulo; TATSUO, Maria A.K.F; DUARTE, Igor D.G. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 400, n. 1, p. 67-71, jul. 2000.
- 163 PRADO, Wiliam A.; SCHIAVON, Viviane F.; CUNHA, Fernando Q.. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 441, n. 1-2, p. 57-65, abr. 2002.
- 164 VERCELINO, Rafael; CUNHA, Thiago Mattar; FERREIRA, Elisa Silva; CUNHA, Fernando Q.; FERREIRA, Sérgio H.; OLIVEIRA, Marcelo G. de. Skin vasodilation and analgesic effect of a topical nitric oxide-releasing hydrogel. **Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 2157-2169, 12 jun. 2013
- 165 MICLESCU, A.; GORDH, T.. Nitric oxide and pain: ÷something old, something new ÷. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 1107-1120, out. 2009.
- 166 OLIVEIRA, Marcelo Ganzarolli de. S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 119, p. 49-56, 29 abr. 2016
- 167 COLLOCA, Luana; LUDMAN, Taylor; BOUHASSIRA, Didier; BARON, Ralf; DICKENSON, Anthony H.; YARNITSKY, David; FREEMAN, Roy; TRUINI, Andrea; ATTAL, Nadine; FINNERUP, Nanna B.. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-19, 16 fev. 2017.
- 168 MAHARANI, Dina Kartika; KARTINI, Indriana; APRILITA, Nurul Hidayat; ABDULLAH, Mikrajuddin; KHAIRURRIJAL. Nanosilica-Chitosan Composite Coating on Cotton Fabrics. **Aip Conference Proceedings**, [S.L.], p. 87-91, 2010.

- 169 SONG, Junlong; WANG, Chaoxia; HINESTROZA, Juan P.. Electrostatic assembly of core-corona silica nanoparticles onto cotton fibers. **Cellulose**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 1727-1736, 9 abr. 2013.
- 170 TOMLIČ, Brigita; SIMONČIČ, Barbara; OREL, Boris; ŠERJAV, Metka; SCHROERS, Hans; SIMONČIČ, Andrej; SAMARDŽIJA, Zoran. Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 618-626, fev. 2009.
- 171 LIN, Dongmei; ZENG, Xingrong; LI, Hongqiang; LAI, Xuejun; WU, Tongyi. One-pot fabrication of superhydrophobic and flame-retardant coatings on cotton fabrics via sol-gel reaction. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 533, p. 198-206, jan. 2019.
- 172 TARIMALA, Sowmitri; KOTHARI, Neha; ABIDI, Nouredine; HEQUET, Eric; FRALICK, Joe; DAI, Lenore L.. New approach to antibacterial treatment of cotton fabric with silver nanoparticle-doped silica using sol-gel process. **Journal Of Applied Polymer Science**, [S.L.], v. 101, n. 5, p. 2938-2943, 2006.
- 173 JIANG, C.; LIU, W.; SUN, Y.; LIU, C.; YANG, M.; WANG, Z.. Fabrication of durable superhydrophobic and superoleophilic cotton fabric with fluorinated silica sol via sol-gel process. **Journal Of Applied Polymer Science**, [S.L.], v. 136, n. 4, p. 47005, 23 ago. 2018.
- 174 IALENTI, Armando; IANARO, Angela; MONCADA, Salvador; ROSA, Massimo di. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 211, n. 2, p. 177-182, fev. 1992.
- 175 CATERINA, R de; LIBBY, P; PENG, H B; THANNICKAL, V J; RAJAVASHISTH, T B; A GIMBRONE, M; SHIN, W s; LIAO, J K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 96, n. 1, p. 60-68, 1 jul. 1995.
- 176 CHUNG, C; LEE, M; CHOE, E. Characterization of cotton fabric scouring by FT-IR ATR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 417-420, 7 dez. 2004.
- 177 NATALIO, Filipe; MARIA, Raquel. Structural Evolution of *Gossypium hirsutum* Fibers Grown under Greenhouse and Hydroponic Conditions. **Fibers**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 11, 12 fev. 2018.

- 178 IBRAHIM, Saher Fawzy; EL-AMOUDY, E. S.; SHADY, K.e.. Thermal Analysis and Characterization of Some Cellulosic Fabrics Dyed by a New Natural Dye and Mordanted with Different Mordants. **International Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 40-54, 13 jun. 2011.
- 179 Substâncias registadas - ECHA, (n.d.). <https://echa.europa.eu/pt/information-on-chemicals/registered-substances> (accessado em 7 de abril de 2021).
- 180 PAYEN, Christine; COMBE, Christian; MEUR, Catherine Le; GAILLARD, Yvan; PULCE, Corine; DESCOTES, Jacques. Lethal acute poisoning with potassium ferrocyanide. **The American Journal Of Emergency Medicine**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 1-6, jun. 2010

## APENDICE A- COPYRIGHTS

### Copyright

05/02/2022 15:24

Rightslink® by Copyright Clearance Center



[Home](#)
[Help](#)
[Email Support](#)
[Sign in](#)
[Create Account](#)

#### Incorporation of Nitroprusside on Silica Nanoparticles—A Strategy for Safer Use of This NO Donor in Therapy



Author: Pedro M. Silva Filho, Iury A. Paz, Nilberto R. F. Nascimento, et al

Publication: Molecular Pharmaceutics

Publisher: American Chemical Society

Date: Jul 1, 2019

Copyright © 2019, American Chemical Society

#### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/2



Home



Help ▾



Email Support



Sign in



Create Account



### The biofilm inhibition activity of a NO donor nanosilica with enhanced antibiotics action

#### Author:

Pedro Martins da Silva Filho, Alexandre Lopes Andrade, Jessica Barros Arrais Cruz Lopes, Aryane de Azevedo Pinheiro, Mayron Alves de Vasconcelos, Saíd Gonçalves da Cruz Fonseca, Luiz Gonzaga de França Lopes, Eduardo Henrique Silva Sousa et al.

Publication: International Journal of Pharmaceutics

Publisher: Elsevier

Date: 15 December 2021

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

## Gráfico 4

06/02/2022 15:30

RightsLink Printable License

**SPRINGER NATURE LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 06, 2022

---

This Agreement between UFC -- Pedro Silva Filho ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number            5243170962721

License date                Feb 06, 2022

Licensed Content  
Publisher                    Springer Nature

Licensed Content  
Publication                 Pharmaceutical Research

Licensed Content Title    Highlights in Mesoporous Silica Nanoparticles as a  
Multifunctional Controlled Drug Delivery Nanoplatform for  
Infectious Diseases Treatment

Licensed Content Author   Gabriela Corrêa Carvalho et al

Licensed Content Date    Sep 7, 2020

<https://i5100.copyright.com/AppDispatchServlet>

Gráfico 12

06/02/2022 15:38 Rightslink® by Copyright Clearance Center



Home
Help ▾
Email Support
Pedro Silva Filho ▾

---



ACS Publications  
Meeting the World's Needs

**Inorganic/Organic Hybrid Silica Nanoparticles as a Nitric Oxide Delivery Scaffold**

Author: Jae Ho Shin, Mark H. Schoenftsch  
 Publication: Chemistry of Materials  
 Publisher: American Chemical Society  
 Date: Jan 1, 2008  
 Copyright © 2008, American Chemical Society

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK
CLOSE WINDOW

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions  
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

Gráfico 13

06/02/2022 15:41 Rightslink® by Copyright Clearance Center



Home | Help | Email Support | Pedro Silva Riho

---



**ACS Publications**  
Medicine | Analytical | Materials

**Direct Formation of S-Nitroso Silica Nanoparticles from a Single Silica Source**

Author: Hung-Chang Chou, Shih-jiuan Chiu, Ying-Ling Liu, et al

Publication: Langmuir

Publisher: American Chemical Society

Date: Jan 1, 2014

Copyright © 2014, American Chemical Society

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK
CLOSE WINDOW

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer-care@copyright.com](mailto:customer-care@copyright.com)

Gráfico 14

06/02/2022 15:52

<https://marketplace.copyright.com/rs-uf-web/mp/checkout/confirmation-details/9b2e00ef-b253-467a-9219-11cbe2363f65>

## Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

### CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

#### Billing Address

Pedro Silva Filho  
UFC  
Ce-060, 5363  
Pacatuba, Ceará 80500-000  
Brazil

+55 (85)987044874  
pedrolesiem@gmail.com

#### Customer Location

Pedro Silva Filho  
UFC  
Ce-060, 5363  
Pacatuba, Ceará 80500-000  
Brazil

#### PO Number (optional)

N/A

#### Payment options

Invoice

### PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 06-Feb-2022

#### 1. Nanoscale

0.00 USD

Article: Multivalent mesoporous silica nanoparticles photo-delivering nitric oxide with carbon dots as fluorescence reporters.

Order License ID	Pending	Publisher	RSC Pub
ISSN	2040-3364	Portion	Image/photo/illustration
Type of Use	Republish in a thesis/dissertation		

#### LICENSED CONTENT

Publication Title	Nanoscale	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
		Publication Type	Journal

## Gráfico 15

06/02/2022 15:57

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Feb 06, 2022

---

This Agreement between UFC -- Pedro Silva Filho ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5243181439861
License date	Feb 06, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Colloid and Interface Science
Licensed Content Title	A regenerable ruthenium tetraammine nitrosyl complex immobilized on a modified silica gel surface: Preparation and studies of nitric oxide release and nitrite-to-NO conversion
Licensed Content Author	Fabio Gorzoni Doro,Ubirajara P. Rodrigues-Filho,E. Tfoumi
Licensed Content Date	Mar 15, 2007
Licensed Content Volume	307
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	13
Start Page	405
End Page	417
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/7

## Gráficos 16 e 18

06/02/2022 16:05

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Feb 06, 2022

---

This Agreement between UFC -- Pedro Silva Filho ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5243190406571

License date Feb 06, 2022

Licensed Content Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content Publication Angewandte Chemie International Edition

Licensed Content Title Glucose-Responsive Sequential Generation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide for Synergistic Cancer Starving-Like/Gas Therapy

Licensed Content Author Xiaoyuan Chen, Tianfu Wang, Junle Qu, et al

Licensed Content Date Dec 9, 2016

Licensed Content Volume 56

Licensed Content Issue 5

Licensed Content 5

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/5

06/02/2022 16:07

Rightslink® by Copyright Clearance Center



Home



Help ▾



Email Support



Pedro Silva Filho ▾

### Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticle Inhibition of Ovarian Cancer Cell Growth



Author: Ellen V. Stevens, Alexis W. Carpenter, Jae Ho Shin, et al

Publication: Molecular Pharmaceutics

Publisher: American Chemical Society

Date: Jun 1, 2010

Copyright © 2010, American Chemical Society

#### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)  
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer-care@copyright.com](mailto:customer-care@copyright.com)