

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

PROPRIEDADES ANTIBACTERIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO: UM ESTUDO *IN VITRO*

DANIELLY STÉFANY BARBOSA DIAS DE CASTRO

BRASÍLIA, DF

2025



DANIELLY STÉFANY BARBOSA DIAS DE CASTRO

PROPRIEDADES ANTIBACTERIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO: UM ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós – Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra Laise Rodrigues de Andrade

BRASÍLIA, DF



DANIELLY STÉFANY BARBOSA DIAS DE CASTRO

PROPRIEDADES ANTIBACTERIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO: UM ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós – Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Laise Rodrigues de Andrade (Presidente)

Prof. Dr. Leonardo Pereira Franchi
(Membro titular)

Profa. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro (Membro titular)

Dra. Melissa Silva Monteiro (Suplente)



"A sabedoria é a principal coisa; adquire a sabedoria, e com todos os teus bens adquire o entendimento."

(Provérbios 4:7)



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha, Yasmin, que me ensinou o verdadeiro significado do amor, um sentimento impossível de mensurar. Tudo isso é para ajudar a construir um futuro melhor para você. Ao meu esposo, Alex, que esteve ao meu lado com apoio e dedicação incondicional em cada etapa da minha jornada acadêmica. Aos meus pais, Arialdo e Edilene, cuja força e dedicação tornaram possível que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e pela oportunidade de chegar até aqui. Não por meus méritos, mas por Sua infinita misericórdia.

À minha filha Yasmin, minha verdadeira motivação. Você me inspira todos os dias a aprimorar meus conhecimentos, com o objetivo de te proporcionar um futuro melhor e confortável. Te amo, filha! Ao meu esposo, Alex, que me compreendeu nas longas jornadas de trabalho durante os fins de semana e feriados, quando precisei me ausentar. Obrigada pelo seu apoio incondicional em todos os aspectos da minha vida. Te amo muito!

Aos meus pais, pelo incentivo constante desde a minha infância. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos e por investirem não só financeiramente, mas também com seu tempo, me ajudando em tudo o que precisei para chegar até aqui. Pai e mãe, obrigada por cuidarem da Yasmin, por me ajudarem em tudo que precisei. Às minhas irmãs, Gabi e Grazi, que foram meu porto seguro, me ajudando e me ouvindo nos momentos difíceis. Obrigada também pela ajuda com a Yasmin. Eu amo muito vocês!

À minha orientadora, Dra. Laise Rodrigues de Andrade, pela paciência em me ensinar tudo, desde os conceitos mais básicos até os mais avançados, pelas orientações valiosas e por me ajudar a me tornar uma grande profissional. Professora, você é minha inspiração para seguir na área do magistério.

Ao professor Dr. Leonardo Giordano Paterno, por ceder gentilmente as nanopartículas de cério utilizadas neste estudo. Ao Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, que auxiliou na disponibilização dos materiais para meus experimentos. Ao Dr. Victor Mello, ao Dr. Carlos Santana, ao Dr. Osmindo Rodrigues e ao Dr. Raffael Castro pelas colaborações na execução de alguns experimentos.

A todos os colegas e à equipe do Departamento de Genética e Morfologia, que me auxiliaram em tudo o que precisei durante esta jornada.

Aos componentes da banca examinadora, Leonardo Pereira Franchi, Marcella Lemos Brettas Carneiro e Melissa Silva Monteiro, que gentilmente aceitaram participar da banca.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, que foi essencial para a realização deste trabalho.



RESUMO

As nanopartículas de óxido de cério (NpCeO2) destacam-se por sua habilidade de alternar entre os estados Ce3+ e Ce4+, conferindo-lhes propriedades redox ideais para aplicações em catálise, antioxidantes e terapias avançadas. Este estudo analisou novas NpCeO2 funcionalizadas com citrato de sódio em formatos de bastão (NCB) e esfera (NCE), considerando aspectos físico-químicos (diâmetro hidrodinâmico - DH, índice de polidispersão - PDI e potencial zeta - PZ) e efeitos biológicos in vitro, incluindo atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e de migração e proliferação celular. As medições indicaram que a NCB possui DH de 85,78 ± 3,22 nm, PDI de 0,24 ± 0,02 e PZ de -53,42 ± 12,08 mV. Já a NCE apresentou valores de 140,06 ± 11,2 nm, 0,35 ± 0,05 e -55,23 ± 10,47 mV. Ambas demonstraram estabilidade por 70 dias em temperatura de 4°C. Nos testes de atividade antimicrobiana, realizados por diluição em caldo, S. aureus foi a bactéria mais sensível, com redução de crescimento de 50% e 91%, respectivamente, para NCB e NCE. A viabilidade celular, avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT, revelou diferenças nos valores de concentração inibitória (IC₅₀) entre diferentes linhagens celulares e formatos de nanopartículas. Para macrófagos (RAW 264.7), os valores foram 1176 µg/mL (NCB) e 45,6 μg/mL (NCE); para fibroblastos (NIH-3T3), 992,4 μg/mL (NCB) e 406,3 μg/mL (NCE). Para os estudos subsequentes, foi utilizada apenas a NpCeO2 considerada segura por 24h para ambas as linhagens, equivalente a NCB nas concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 µg/mL. Essas concentrações não apresentaram efeito citostático e citotóxico por um período de até 72h, analisado pelo ensaio de viabilidade em tempo real. Além disso, demonstraram efeito protetor contra o estresse oxidativo em RAW 264.7 ativado por LPS com redução de cerca de 35% nos níveis de espécies reativas de oxigênio quantificados pela sonda DCFDA. A análise anti-inflamatória de NCB, realizada pelos métodos de Griess para dosagem de óxido nítrico (NO) e ELISA para dosagem de citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-10) em RAW 264.7, demonstrou uma redução significativa de 70% de NO em todas as concentrações testadas, e redução de 26% de TNF-α, 48% de IL-6 e 15% de IL-10 na concentração de 81,3 µg/mL. O resultado do ensaio de ranhura em células NIH-3T3 sugere um potencial cicatrizante de NCB promovendo proliferação e migração superiores ao controle em até 15%. Em síntese, este estudo sugere o potencial de NCB como uma abordagem terapêutica promissora, particularmente no tratamento de condições associadas ao estresse oxidativo e processos inflamatórios. Estudos posteriores devem ser realizados para aprofundar nos mecanismos de ação e efeito in vivo da NCB.

Palavras-chave: nanopartículas de óxido de cério, nanocéria, antibacteriana, estresse oxidativo inflamação, regeneração tecidual.



ABSTRACT

Cerium oxide nanoparticles (NpCeO₂) stand out for their ability to alternate between Ce³⁺ and Ce4+ states, granting them ideal redox properties for applications in catalysis, antioxidants, and advanced therapies. This study analyzed novel NpCeO2 functionalized with sodium citrate in rod (NCB) and sphere (NCE) formats, considering physicochemical aspects (hydrodynamic diameter - DH, polydispersity index - PDI, and zeta potential - PZ) and in vitro biological effects, including antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory activities, as well as cell migration and proliferation. Measurements indicated that NCB has a DH of 85.78 \pm 3.22 nm, PDI of 0.24 \pm 0.02, and PZ of -53.42 \pm 12.08 mV, while NCE exhibited values of 140.06 \pm 11.2 nm, 0.35 \pm 0.05, and -55.23 ± 10.47 mV. Both demonstrated stability for 70 days at 4°C. In antimicrobial activity tests performed by broth dilution, S. aureus was the most sensitive bacterium, with a growth reduction of 50% and 91% for NCB and NCE, respectively. Cell viability, assessed through the MTT colorimetric assay, revealed differences in inhibitory concentration (IC50) values between different cell lines and nanoparticle formats. For macrophages (RAW 264.7), the values were 1176 µg/mL (NCB) and 45.6 µg/mL (NCE); for fibroblasts (NIH-3T3), 992.4 µg/mL (NCB) and 406.3 µg/mL (NCE). For subsequent studies, only the NpCeO2 considered safe for 24 hours for both cell lines was used, corresponding to NCB at concentrations of 10.2, 40.6, and 81.3 µg/mL. These concentrations did not show cytostatic or cytotoxic effects for up to 72 hours, as analyzed by the real-time viability assay. Additionally, NCB demonstrated a protective effect against oxidative stress in LPS-activated RAW 264.7 cells, reducing reactive oxygen species levels by approximately 35%, as quantified by the DCFDA probe. The antiinflammatory analysis of NCB, performed using the Griess method for nitric oxide (NO) quantification and ELISA for cytokine quantification (TNF-α, IL-6, and IL-10) in RAW 264.7 cells, showed a significant 70% reduction in NO at all tested concentrations, along with a 26% reduction in TNF-α, 48% in IL-6, and 15% in IL-10 at 81.3 µg/mL. The scratch assay in NIH-3T3 cells suggests a wound-healing potential of NCB, promoting proliferation and migration up to 15% higher than the control. In summary, this study suggests the potential of NCB as a promising therapeutic approach, particularly in treating conditions associated with oxidative stress and inflammatory processes. Further studies should be conducted to deepen the understanding of NCB mechanisms of action and in vivo effects.

Keywords: cerium oxide nanoparticles, nanoceria, antibacterial, oxidative stress, inflammation, tissue regeneration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Avaliação da estabilidade de NCB durante 70 dias após a síntese.
- **Figura 2.** Avaliação da estabilidade de NCE durante 70 dias após a síntese.
- **Figura 3.** Análise da morfologia de NCB e NCE por microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- **Figura 4.** Crescimento bacteriano mediante ao tratamento com diferentes concentrações de NCB e NCE por 24h.
- **Figura 5.** Viabilidade celular de RAW 264.7 e de NIH-3T3 mediante a diferentes concentrações de NCB e de NCE por 24h.
- **Figura 6.** Análise da morfologia celular de RAW 264.7 e de NIH-3T3 após exposição a diferentes concentrações de NCB por 24h.
- **Figura 7.** Análise da morfologia celular de RAW 264.7 e de NIH-3T3 após exposição a diferentes concentrações de NCE por 24h.
- **Figura 8.** Viabilidade celular em tempo real das linhagens (a) RAW 264.7 e (b) NIH-3T3 ao longo de 72h de exposição a diferentes concentrações NCB.
- **Figura 9.** Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células RAW 264.7 após exposição a NCB e LPS.
- **Figura 10.** Morfologia representativa do efeito protetor de NCB contra o estresse oxidativo em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS.
- **Figura 11.** Efeito inibitório de NCB sobre a produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS.
- **Figura 12.** Níveis intracelulares de TNF-α, IL-6 e IL-10 nas células RAW 264.7 após exposição a NCB e LPS.
- **Figura 13.** Cicatrização de feridas em modelo *in vitro* com fibroblastos murinos células NIH-3T3 ao longo de 48h, após exposição a diferentes concentrações NCB.
- **Figura 14.** Imagens representativas do ensaio de ranhura com fibroblastos murinos (NIH-3T3), mostrando a área da ferida sem tratamento (controle) e após o tratamento com NCB em diferentes concentrações, avaliadas após 24 e 48h.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta de NCB a partir de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e dispersão de luz eletroforética (ELS).

Tabela 2. Análises do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial zeta de NCE a partir de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e dispersão de luz eletroforética (ELS).

Tabela 3. Concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) de NCB e NCE em RAW 264.7 e NIH-3T3.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ce - Cério

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CN – Controle Negativo

CP - Controle Positivo

DCF – 2',7'-Dichlorofluoresceina (2',7'-Dichlorofluorescein)

DCFDA – Acetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)

DH - Diâmetro Hidrodinâmico

DLS – Espalhamento de Luz Dinâmica (Dynamic Light Scattering)

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio Padrão

ELS – Dispersão de Luz Eletroforética (Electrophoretic Light Scattering)

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

IC50 – Concentração Inibitória de 50%

IL - Interleucinas

LPS – Lipopolissacarídeo

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil Tetrazolium]

mV - Milivolts

NCB – Nanopartículas de Óxido de Cério Bastonetes

NCE – Nanopartículas de Óxido de Cério Esféricas



NIH-3T3 – Linhagem de Fibroblasto Murino

Nanocéria – Nanopartículas de Óxido de Cério

NO – Óxido Nítrico

nm - Nanômetros

PBS - Solução Salina (Phosphate-Buffered Saline)

PDI – Índice de Polidispersividade (Polydispersity Index)

pH - Potencial Hidrogeniônico

PZ - Potencial Zeta

RAW 264.7 – Linhagem de Macrófago Murino

RLU – Unidades Relativas de Luminescência (Relative Luminescence Units)

RPM – Rotações Por Minuto

SFB - Soro Fetal Bovino

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UnB - Universidade de Brasília

µg – Micrograma

μL – Microlitro



SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	
3. Referencial Teórico	4
3.1 Cério	
3.2 Nanopartículas de Óxido de Cério	5
3.3 Aplicações Biológicas de Nanopartículas de Óxido de Cério	9
3.3.1 Propriedades Antibacterianas	
3.3.2 Propriedades Antioxidantes	
3.3.3 Propriedades Anti-inflamatórias	
3.3.4 Propriedades Cicatrizantes	15
4. Metodologia	17
4.1 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Cério	17
4.2 Caracterização físico-química de NCB e NCE	17
4.3 Análise da Atividade Antibacteriana	17
4.4 Cultura e Manutenção das Células	18
4.5 Avaliação da Citotoxicidade	19
4.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	19
4.5.2 Análise da Morfologia Celular	20
4.5.3 Ensaio de Viabilidade em Tempo Real	20
4.6 Análise da Atividade Antioxidante e Anti-inflamatória	21
4.6.1 Ativação de macrófagos RAW 264.7 por LPS	21
4.6.2 Efeito protetor de NCB contra o estresse oxidativo	21
4.6.3 Dosagem de Óxido Nítrico	22
4.6.4 Dosagem de Citocinas	22

4.7 Análise do Potencial Cicatrizante	23
4.8 Análise Estatística	24
5. Resultados	24
5.1 Estabilidade Físico-Química de NCB e NCE	24
5.2 Análise da Atividade Antibacteriana	26
5.3 Avaliação da Citotoxicidade	29
5.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	29
5.3.2 Análise da Morfologia Celular	31
5.3.3 Ensaio de Viabilidade em Tempo Real	33
5.4 Análise das propriedades antioxidante e anti-inflamatória	35
5.4.1 Efeito Protetor de NCB Contra o Estresse Oxidativo	35
5.4.2 Dosagem de Óxido Nítrico	37
5.4.3 Dosagem de Citocinas	38
5.5 Análise da Atividade Proliferativa	40
6. Discussão	42
7. Conclusões	50
Referências Bibliográficas	51



1. INTRODUÇÃO

O cério (Ce) é um elemento químico do grupo dos lantanídeos, sendo o mais reativo do grupo e um dos metais de terras raras mais abundantes do planeta. Sua capacidade de alternar entre os estados de oxidação +3 e +4, torna-o promissor em diversas tecnologias devido à sua reatividade, propriedades catalíticas e antioxidantes. Ao entrar em contato com o ar, o cério rapidamente se oxida, formando o dióxido de cério (CeO₂), um composto estável e comum na natureza (Brandão da Silva Assis et al., 2024; Scirè & Palmisano, 2020).

A redução do CeO₂ à escala nanométrica oferece vantagens significativas, principalmente para aplicações biomédicas. As nanopartículas de CeO₂, também conhecidas como NpCeO₂, apresentam maior área superficial, permitindo um aumento no número de sítios reativos e amplificação de sua capacidade antioxidante e catalítica (Yadav & Singh, 2021). Além disso, o CeO₂ apresenta defeitos estruturais quando reduzidas à escala nanométrica, aumentando as vacâncias de oxigênios e facilitando a alternância redox entre os estados Ce³⁺ e Ce⁴⁺. Ademais, o uso da nanotecnologia permite que suas propriedades possam ser otimizadas por meio do controle do tamanho, da morfologia e da funcionalização das partículas durante a síntese, influenciando sua interação com células e tecidos, tornando as NpCeO₂ um material versátil e promissor para terapias avançadas (Ma et al., 2022; Singh et al., 2020).

As NpCeO₂ têm demonstrado uma ampla gama de aplicações biomédicas, incluindo atividade antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante. Seu potencial antibacteriano tem sido investigado como uma alternativa eficaz no combate a infecções causadas por bactérias resistentes, oferecendo novas possibilidades de tratamento (Farias et al., 2018; Chatzimentor et al., 2023). Além disso, sua ação antioxidante protege as células contra danos causados por radicais livres e modula a resposta inflamatória, podendo auxiliar na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo e a inflamações crônicas (Corsi et al., 2023). Essas propriedades combinadas também favorecem a regeneração de tecidos danificados, tornando as NpCeO₂ eficazes na cicatrização de feridas e lesões cutâneas (Chen et al., 2024; Yi et al., 2024).

Embora já existam diversos estudos explorando o potencial das NpCeO₂ (Farias et al., 2018; Chatzimentor et al., 2023; Corsi et al., 2023) a influência dos métodos de síntese em suas propriedades demonstra a necessidade de investigações contínuas para explorar



todo o potencial dessas nanopartículas. Neste trabalho, o método de hidrólise alcalina foi escolhido por sua eficiência em controlar tamanho, formato e proporção Ce³+/Ce⁴+, além de proporcionar purificação simples e fácil funcionalização com citrato de sódio.

Apesar dos avanços significativos na síntese de nanopartículas NpCeO₂, a literatura carece de estudos comparativos que avaliem a influência da morfologia das NpCeO₂ nas propriedades físico-químicas e biológicas. Além disso, não foram encontrados trabalhos que investigaram o potencial de NpCeO₂, sintetizadas pelo método de hidrólise alcalina e funcionalizadas com citrato de sódio. Essa lacuna representa uma oportunidade para investigar como diferentes morfologias geradas por essa rota de síntese podem impactar o desempenho e a aplicabilidade desses nanomateriais. Diante desse contexto, este estudo propõe uma abordagem inovadora, desenvolvendo duas NpCeO₂ revestidas com citrato de sódio: uma com formato de bastão (NCB) e outra esférica (NCE). O objetivo central foi avaliar a estabilidade físico-química dessas nanopartículas, bem como seus efeitos biológicos *in vitro*, incluindo citotoxicidade, atividade antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante.

Hipotetiza-se que ambas as morfologias (NCB e NCE) apresentem propriedades físico-químicas superiores em termos de estabilidade, pureza e funcionalização, além de exibirem efeitos biológicos significativos. Espera-se que os dados obtidos contribuam para a compreensão das relações entre estrutura e funcionalidade de NpCeO₂, possibilitando o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes para aplicações biomédicas específicas.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar, *in vitro*, a citotoxicidade e as propriedades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante de nanopartículas de óxido de cério sintetizadas em formatos de bastão (NCB) e esfera (NCE).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as características físico-químicas e a estabilidade de NCB e NCE.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de NCB e NCE frente às cepas de Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli. Avaliar a viabilidade de macrófagos da linhagem RAW 264.7 e de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 tratados com NCB e NCE.
- Avaliar os efeitos de NCB e NCE na morfologia celular de RAW 264.7 e NIH-3T3.
- Avaliar o efeito protetor de NCB contra danos oxidativos induzidos por LPS em macrófagos RAW 264.7.
- Quantificar os níveis de óxido nítrico e dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) em RAW 264.7 ativados por LPS e tratados com NCB.
- Avaliar o efeito de NCB na proliferação e migração de células RAW 264.7 e NIH-3T3.



3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÉRIO

O cério é um elemento químico pertencente ao grupo dos lantanídeos, localizado na tabela periódica com o símbolo Ce e número atômico 58, sendo considerado o elemento mais reativo desse grupo (Scirè & Palmisano, 2020). Ele é um dos metais de terras raras mais abundantes do planeta, sendo comumente encontrado em minerais como monazita e bastnasita, o que o torna de fácil acessibilidade e de baixo custo (Balaram, 2019). Suas propriedades químicas únicas, como a capacidade de exibir diferentes estados de oxidação, tornam o cério um candidato promissor para diversas tecnologias (Ernst & Puntes, 2022).

O cério, como membro da série dos lantanídeos, exibe uma valência de +3, mas também pode se encontrar no estado de oxidação +4, assim, pode apresentar dois estados de oxidação, Ce³+ e Ce⁴+, formando óxidos distintos: o sesquióxido de cério (Ce₂O₃) e dióxido de cério (CeO₂), respectivamente. Essa capacidade de alternar entre os estados +3 e +4 é altamente eficiente e pode ocorrer de maneira reversível, o que confere ao cério excelentes propriedades catalíticas e antioxidantes, pois é essa alternância que confere ao cério, possuir grande reatividade (Brandão da Silva Assis et al., 2024; Scirè & Palmisano, 2020).

O CeO₂ é o mais abundante na natureza do que Ce₂O₃, pois é significativamente mais estável em condições ambientais normais de temperatura e pressão ambiente. Esse composto é formado quando o cério entra em contato com oxigênio atmosférico, o que favorece sua ocorrência na crosta terrestre. Além disso, o CeO₂ é mais estável que seu sesquióxido Ce₂O₃ devido às diferenças estruturais entre os compostos. CeO₂ possui estrutura cúbica de face centrada, por outro lado, o Ce₂O₃, apresenta estrutura hexagonal. A estrutura cúbica do CeO₂ é altamente simétrica e por isso energeticamente mais favorável. Além disso, o CeO₂ possui uma notável capacidade de formar vacâncias de oxigênio devido à sua estrutura cristalina e à presença de cátions de cério em diferentes estados de oxidação, permitindo que ele atue como um excelente doador e captador de oxigênio (Mishra & Ahmaruzzaman, 2021).

Dessa forma, as propriedades do CeO₂ o tornam um agente promissor para uma ampla gama de aplicações tecnológicas e biomédicas. O CeO₂, tem atraído atenção devido

à sua capacidade de atuar como um catalisador eficiente, especialmente em reações de oxidação e redução. Essa capacidade é explorada em catalisadores automotivos, onde o CeO₂ é utilizado para reduzir a emissão de gases poluentes, como monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NOx) e hidrocarbonetos não queimados, atuando como um catalisador de três vias, facilitando a conversão desses poluentes em compostos menos prejudiciais (Melchionna et al., 2020).

Além disso, o CeO₂ tem sido amplamente estudado em aplicações na área de energia, principalmente como parte de sistemas de armazenamento de energia. Sua capacidade de alternar entre os estados de oxidação Ce³⁺ e Ce⁴⁺ torna o CeO₂ ideal para o desenvolvimento de supercapacitores e baterias de íon-lítio mais eficientes, já que o material pode armazenar e liberar energia de forma eficaz durante os ciclos de carga e descarga (Kowsuki et al., 2023).

No campo da biomedicina, o CeO₂ tem se mostrado promissor devido às suas propriedades antioxidantes e sua capacidade de atuar em processos redox. Ele vem sendo investigado como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como doenças neurodegenerativas (Hanzha et al., 2023; Pinna et al., 2015), câncer (Javid et al., 2022) e doenças hepáticas (Carvajal et al., 2019). Sua ação neutralizando espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo, protege as células contra danos causados por esses radicais livres, o que pode prevenir ou retardar a progressão dessas doenças. Além disso, também pode ser utilizado para modular respostas inflamatórias no corpo (Ernst & Puntes, 2022).

Embora o CeO₂ já demonstre propriedades notáveis, como sua capacidade redox e estabilidade química, sua estrutura pode ser modificada através de diversos métodos, que pode levar a um desempenho aprimorado desse composto. É nesse contexto que a nanotecnologia surge como uma ferramenta transformadora. A redução do CeO₂ à escala nanométrica não apenas potencializa suas propriedades intrínsecas, mas também adiciona novos atributos que ampliam suas possibilidades de aplicação.

3.2 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO CÉRIO

A redução do tamanho das partículas de CeO₂ para a escala nanométrica resulta em uma série de modificações nas suas propriedades químicas, principalmente no que diz respeito a reações redox e atividades catalíticas. Em nanopartículas, a área superficial é

aumentada proporcionando um maior número de sítios reativos e amplificando a capacidade do CeO₂ de neutralizar radicais livres. Além disso, a morfologia e o tamanho das partículas, que são facilmente manipuladas, podem influenciar diretamente a sua carga superficial e a interação com células biológicas, o que é crucial para o seu uso em terapias direcionadas (Singh et al., 2020; Yadav & Singh, 2021).

As NpCeO₂ apresentam defeitos estruturais que criam locais reativos na superfície, permitindo a troca redox entre os estados Ce³⁺ e Ce⁴⁺. O estado de oxidação primário do CeO₂ é o Ce⁴⁺; no entanto, na escala nanométrica, os defeitos na estrutura cristalina permitem o estado de valência Ce³⁺ em vez de Ce⁴⁺, gerando defeitos estruturais compensados pela formação de vacâncias de oxigênio na superfície das nanopartículas. Essa propriedade permite que as NpCeO₂ desempenhem um papel fundamental na atividade redox do material (Ma et al., 2021; Singh et al., 2020).

Yadav & Singh (2021) afirmaram que o tamanho das nanopartículas e a técnica de síntese podem influenciar diretamente na concentração de íons Ce³+ e na densidade das vacâncias de oxigênio. Isso, por sua vez, impacta na capacidade antioxidante e catalítica do CeO₂. Os autores elencaram que diferentes métodos de síntese podem controlar cuidadosamente o tamanho das partículas e os parâmetros do processo podem aumentar a proporção de Ce³+ e vacâncias de oxigênio, otimizando as propriedades redox da NpCeO₂.

Essa deficiência de oxigênio em nanoescala confere às NpCeO₂ uma notável atividade catalítica mimética de diversas enzimas antioxidantes. Elas são capazes de catalisar a dismutação de ânions superóxido (O₂⁻) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (O₂), desempenhando um papel essencial na proteção contra danos oxidativos. Além disso, as NpCeO₂ possuem a habilidade de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, imitando a função da enzima catalase. Adicionalmente, podem catalisar reações envolvendo peróxidos, exercendo uma atividade semelhante à enzima peroxidase, o que amplia ainda mais sua aplicabilidade em processos biológicos e terapêuticos (Ma et al., 2021; Yadav & Singh, 2021).

Ademais, a NpCeO₂ também se destaca por sua fácil metabolização por organismos vivos. Embora o dióxido de cério seja conhecido como um material de difícil metabolização em sua forma macroscópica, as NpCeO₂ são metabolizadas mais facilmente, liberando íons Ce³⁺ solúveis que são excretados pelo corpo, principalmente pela urina. Esse processo de

degradação está relacionado ao comportamento redox da NpCeO₂, com sua dissolução favorecida em ambientes de pH baixo e concentrados em oxigênio reduzido, como os endolisossomos. A taxa de dissolução da NpCeO₂ aumenta com a diminuição do tamanho da partícula, o que facilita a excreção do material do organismo (Ernst & Puntes, 2022).

Apesar de seu grande potencial terapêutico, a toxicidade das NpCeO₂ ainda é uma preocupação importante. Ma et al. (2021) avaliou a citotoxicidade dependente do tamanho de NpCeO₂ em células do epitélio pigmentar da retina humana (ARPE-19), para isso utilizaram NpCeO₂ de 15, 30 e 45 nm. Todas as concentrações (variando de 3,1 a 100 μg/mL) e todos os tamanhos apresentaram citotoxicidade. No entanto, outro trabalho de K. Wang et al. (2018) demonstrou que NpCeO₂ revestidas com oligoquitosana, de 135 nm, não causaram toxicidade em células ARPE-19 em concentrações variando de (100 a 1000 mg/mL).

Dessa forma, as propriedades superficiais das NpCeO₂, como rugosidade, carga, grupos funcionais, tamanho e formato, influenciam diretamente sua interação com células e tecidos e devem ser consideradas para a modulação da toxicidade. A modificação da superfície das nanopartículas pode melhorar sua biocompatibilidade, reduzir sua toxicidade e aumentar sua eficácia terapêutica. Além disso, a funcionalização da superfície das nanopartículas de CeO₂ com grupos específicos permite direcionar essas partículas para locais específicos no organismo, otimizando a entrega de medicamentos (Fu et al., 2024).

Nesse contexto, o citrato de sódio, um sal derivado do ácido cítrico, emerge como um agente de funcionalização promissor. Ele atua formando uma camada superficial que confere carga negativa às partículas, promovendo repulsão eletrostática e evitando a agregação. Essa funcionalização melhora a estabilidade coloidal, o controle do tamanho das nanopartículas e reduz a citotoxicidade, aumentando sua biocompatibilidade (Cândido et al., 2024; De Sá et al., 2015).

Embora não tenham sido encontrados estudos que utilizem citrato de sódio como agente de revestimento para NpCeO₂ sintetizadas via hidrólise alcalina, pesquisas com outras rotas de síntese e agentes de revestimento semelhantes demonstram boas propriedades terapêuticas. Por exemplo, Estevez et al. (2019) investigaram a atividade antioxidante e os efeitos neuroprotetores de NpCeO₂ sintetizadas pelo método hidrotermal e estabilizadas com ácido cítrico (CA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As NpCeO₂ estabilizadas com uma proporção 50/50 de CA/EDTA mostraram o maior efeito



neuroprotetor, enquanto as estabilizadas apenas com CA apresentaram maior atividade catalase, destacando a eficiência do revestimento com CA.

Além disso, Silina et al. (2024) utilizaram NpCeO₂ revestidas com citrato de amônio e avaliaram sua atividade antibacteriana. Os resultados mostraram um efeito bacteriostático significativo e dependente da dose, com maior eficácia contra *E. coli, B. subtilis* e *S. aureus*, especialmente em concentrações mais altas (10⁻² M e 10⁻³ M) nas primeiras 24–48h. Entretanto, em nenhum caso foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Outro estudo de Silina et al. (2023) investigaram a citotoxicidade das mesmas NpCeO₂ e seu impacto em células envolvidas na regeneração de células da pele, como fibroblastos, células-tronco mesenquimais e queratinócitos. Os resultados indicaram que, nas concentrações de 10⁻⁴ M a 10⁻⁶ M, as NpCeO₂ não apresentaram citotoxicidade, mas não promoveram alterações na proliferação celular.

Assim, as NpCeO₂ apresentam diversas vantagens que tornam suas aplicações biológicas promissoras no contexto atual. Outros estudos, utilizando NpCeO₂ com outras características físico-químicas, também demonstram sua eficiência em múltiplas atividades biológicas. Por exemplo, Zamani et al. (2021) testaram o efeito de NpCeO₂ revestidas com gelatina-policaprolactona contra *P. aeruginosa* e observaram uma excelente atividade antibacteriana, com 50 μg/mL inibindo 99,9% do crescimento bacteriano. Hijaz et al. (2016) avaliaram a atividade anticâncer de NpCeO₂ revestidas de ácido fólico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e verificaram que, em células de câncer de ovário (A2780 e C200), essas NpCeO₂ inibiram a proliferação celular em concentrações de 10 a 100 μM. Em camundongos tratados com 0,1 mg/kg, foi constatada uma redução significativa na carga tumoral sem toxicidade a órgãos vitais.

Além disso, Khan et al. (2023) demonstraram que NpCeO₂ sintetizadas a partir de extrato de folhas de *Mentha royleana* apresentaram excelente atividade antioxidante, similar ao ácido ascórbico, com concentrações variando de 62,5 a 1000 μg/mL. Já Hashem et al. (2015) investigaram a eficácia de NpCeO₂ na hepatotoxicidade induzida por D-galactoseamina e lipopolissacarídeo (D-GALN/LPS) em ratos *Wistar*, mostrando que doses de 0,01 μg/kg reduziram significativamente os níveis de óxido nítrico. O estudo também apontou um forte efeito antioxidante, evidenciado pelo aumento significativo nos níveis de glutationa (GSH), glutationa peroxidase (GPX1), glutationa redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e catalase.



Assim, as NpCeO₂ representam uma abordagem inovadora e promissora para aplicações biomédicas, combinando propriedades únicas que permitem sua utilização em terapias avançadas. Seu potencial para combater bactérias resistentes, atuar em processos antioxidantes, anti-inflamatórios, entre outros, reforça a relevância de estudos contínuos de novas NpCeO₂ para ampliar sua aplicabilidade clínica, contribuindo para avanços significativos na saúde.

3.3 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CÉRIO

3.3.1 PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS

A incidência de infecções relacionadas a patologias é expressiva, com ênfase em infecções da corrente sanguínea, do trato urinário associadas a cateteres e de sítios cirúrgicos. Os principais agentes causadores incluem bactérias gram-negativas e gram-positivas. Alarmantemente, cerca de 20% dessas infecções envolvem microrganismos resistentes a antibióticos, um cenário que preocupa a comunidade médica global, dada a limitada disponibilidade de antibióticos eficazes. Em resposta a esse desafio, a comunidade científica tem se dedicado à busca por novas substâncias com propriedades antibacterianas para ampliar as opções terapêuticas (Laxminarayan et al., 2020).

Nesse contexto, o cério tem emergido como um agente promissor, atraindo atenção por seu potencial antibacteriano. Embora o mecanismo exato da atividade antibacteriana das NpCeO₂ ainda não esteja completamente elucidado, propõe-se que a interação direta das NpCeO₂ com a membrana celular bacteriana pode perturbar a estrutura da membrana e causar vazamento de íons e outros componentes intracelulares. Além disso, após a adsorção à superfície bacteriana, as NpCeO₂ podem afetar o crescimento bacteriano, interferindo no transporte de nutrientes entre as bactérias e o ambiente externo (Zhang et al., 2019).

Jing et al. (2014) demonstraram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM), que as NpCeO₂, com tamanho variando entre 80 e 100 nm e concentração entre 5 a 30 ppm, entram em contato direto com a parede celular e a membrana de biofilmes após 8h de exposição em solução nutritiva. Esses resultados indicam que as NpCeO₂ podem se agregar e se ligar a estruturas bacterianas, como esporos e pelotas, alterando a membrana celular, contribuindo para sua atividade antimicrobiana.

Outro mecanismo relevante é a geração de ERO, como radicais livres e peróxido de hidrogênio. Como descrito anteriormente, as NpCeO₂ podem atuar como catalisadores miméticos de diversas enzimas antioxidantes. No entanto, Ma et al. (2022) demonstraram que as NpCeO₂ imitam a atividade dessas enzimas apenas em condições de pH fisiológico básico (em torno de 7,4). Em microambientes com pH ácido, elas exibem uma atividade pró-oxidante e citotóxica. Esse comportamento redox exclusivo do óxido de cério permite que ele proteja células normais em ambientes neutros ou alcalinos, ao mesmo tempo em que manifesta efeitos citotóxicos contra bactérias em condições ácidas (Zhang et al., 2019).

Essa formação de ERO pode causar danos oxidativos às membranas lipídicas, comprometendo a integridade estrutural das células bacterianas, levando à perda de funcionalidade e à morte celular. A geração de ERO provocada por essa interação, também causa danos no DNA bacteriano e altera a produção de proteínas. Como consequência, há uma inibição no transporte de nutrientes para a célula, o que, por fim, leva à morte celular (Ahmad et al., 2023).

Outro aspecto importante para avaliar a capacidade antibacteriana das NpCeO₂ são suas características físico-químicas como tamanho, forma, carga de superfície e estado de oxidação. Essas propriedades influenciam diretamente a interação das NpCeO₂ com as células bacterianas e determinam o grau de eficácia na modulação de sua atividade antibacteriana. Compreender como essas variáveis afetam o comportamento das NpCeO₂ é essencial para otimizar seu uso terapêutico e potencializar suas propriedades antimicrobianas.

Como por exemplo, Gajbhiye et al. (2024) demonstraram que duas NpCeO₂ de diferentes tamanhos (22 nm e 70 nm) e morfologias (esféricas e cúbicas) apresentam atividades antibacterianas contra diferentes bactérias. Os autores evidenciam que, em uma concentração de 500 µg/mL e 1000 µg/mL, as nanopartículas esféricas apresentaram melhor atividade antibacteriana do que as nanopartículas cúbicas. As partículas esféricas geraram uma maior zona de inibição contra *E. coli* e *S. aureus*, em comparação com as partículas cúbicas, que não apresentaram atividade antibacteriana significativa.

Outro exemplo é o estudo de Alpaslan et al. (2017) em que foi observado que as NpCeO₂ carregadas positivamente, a uma concentração de 500 µg/mL, provocaram uma inibição mais significativa do crescimento de bactérias como *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, quando comparadas às NpCeO₂ com carga negativa, demonstrando, assim, que as cargas

influenciam diretamente na atividade antibacteriana. Um trabalho publicado por Muthuvel et al. (2020) utilizaram NpCeO₂ esféricas de 21 nm, sintetizadas a partir de *Calotropis procera*, para determinar as propriedades antibacterianas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. saprophyticus* e *E. coli*). A eficiência antibacteriana demonstrou excelentes resultados na concentração de 100 µg/mL através do método de difusão em disco.

Dessa forma, as propriedades antibacterianas NpCeO₂ vem se mostrando como uma solução inovadora no combate a infecções bacterianas, especialmente frente à crescente resistência aos antibióticos convencionais.

3.3.2 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo é um estado patológico que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante da célula para neutralizá-las ou repará-las. Esse desequilíbrio provoca danos severos a macromoléculas essenciais, como proteínas, lipídios e DNA, comprometendo a integridade e funcionalidade celular. Além disso, o estresse oxidativo interfere em vias de sinalização intracelular, desencadeando processos como apoptose, inflamação e até alterações no ciclo celular. Essa condição está associada a diversas doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, ressaltando a importância de mecanismos antioxidantes eficientes para a manutenção da homeostase celular (Balachandar et al., 2021; Ghezzi, 2020).

Um antioxidante é uma substância, de origem natural ou sintética, capaz de prevenir, inibir ou retardar a degradação de substratos oxidáveis, mesmo em baixas concentrações, ao controlar o processo de oxidação (Fernandes et al., 2018). Nesse contexto, as NpCeO₂ têm se destacado na nanomedicina devido às suas notáveis propriedades redox, atribuídas à presença de sítios de vacância de oxigênio e à atividade mimética de diversas enzimas antioxidantes, conforme mencionado anteriormente. Essas características tornam as NpCeO₂ promissoras no restabelecimento da homeostase tecidual (Lord et al., 2021).

Akhtar et al. (2021)2021) analisou a atuação de NpCeO₂ de 50 nm e formato cúbico como potenciais agentes miméticos de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). O estudo demonstrou que em células HUVEC expostas a NpCeO₂ na dose de 100 µg/mL houve um aumento das atividades da glutationa redutase ativada (GR) e da glutationa peroxidase, além de neutralizar ERO e NO. Essas NpCeO₂ fortalecem as células contra o

estresse oxidativo induzido por agentes externos como H_2O_2 e doadores de NO e preservam o potencial de membrana mitocondrial, promovendo a recuperação do equilíbrio redox celular.

Yadav & Singh (2021) desenvolveram duas NpCeO₂ com revestimentos distintos para aprimorar a capacidade antioxidante dessas nanopartículas. As NpCeO₂ revestidas com ácido fosfomolíbdico (PMA) e ácido fosfotúngstico (PTA) apresentaram tamanhos semelhantes, em torno de 25 nm. Os resultados demonstraram que as NpCeO₂ revestidas com PTA a 150 μM exibiram maior atividade mimética às enzimas SOD e catalase em comparação às revestidas com PMA, sendo mais eficazes na redução dos níveis de ERO em células hepáticas humanas (WRL-68). Os autores atribuem esse desempenho superior ao fato de o PTA estabilizar as nanopartículas de cério no estado Ce³⁺, o que favorece a formação de vacâncias de oxigênio, essenciais para a atividade antioxidante.

Rubio et al. (2016) destacaram a notável capacidade antioxidante de NpCeO₂ com morfologia cúbica/triangular, de aproximadamente 9,5 nm, em células epiteliais pulmonares humanas (BEAS-2B). As NpCeO₂ apresentaram excelente biocompatibilidade em concentrações entre 2,5 e 7,5 μg/mL e demonstraram um forte efeito protetor contra danos oxidativos induzidos pelo agente KBrO₃. O pré-tratamento com essas nanopartículas reduziu significativamente a geração de ERO, restaurando os níveis para valores semelhantes aos observados em células não tratadas, com destaque para a concentração de 5 μg/mL.

Esses trabalhos citados anteriormente confirmam que as NpCeO₂ promovem proteção celular e podem auxiliar na recuperação do estresse oxidativo e destacando seu potencial como agentes antioxidantes eficazes.

3.3.3 PROPRIEDADES ANTIINFLAMATÓRIAS

A inflamação é uma resposta anormal do organismo, em que o sistema imunológico reage a estímulos provenientes de diversos agentes lesivos. Normalmente, a inflamação é protetora contra lesões, servindo como mecanismo de defesa e reparo. Porém, quando a inflamação é descontrolada, pode ocasionar danos nos tecidos e órgãos, sendo responsável por várias condições patológicas. Este processo contém a interação de diversos componentes, como as células imunes inatas, as células imunes adaptativas e as

células endoteliais, que trabalham em conjunto para retirar o agente inflamatório e iniciar o processo de reparo. Os moduladores fundamentais bioquímicos e controladores da inflamação incluem ERO, eicosanóides, citocinas e quimiocinas (Wang et al., 2024).

A presença prolongada ou contínua de estresse oxidativo desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e agravamento de doenças inflamatórias. Nesse sentido, uma abordagem terapêutica baseada em antioxidantes surge como uma estratégia ideal para tratar condições relacionadas à inflamação. O efeito antioxidante das NpCeO₂, portanto, pode se tornar um importante aliado em terapias anti-inflamatórias eficazes (Corsi et al., 2023). Assim, a remoção de ERO mediada por NpCeO₂ configura-se como uma abordagem terapêutica promissora para mitigar a inflamação (Wang et al., 2024).

Ainda não há consenso na literatura científica sobre os mecanismos exatos de ação das NpCeO₂ como agentes anti-inflamatórios. No entanto, a hipótese mais aceita é que os efeitos anti-inflamatórios das NpCeO₂ estão frequentemente associados à sua destacada atividade antioxidante, considerando que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na inflamação. Nesse contexto, a ação mimética das NpCeO₂, as enzimas SOD e CAT, por desempenharem papéis importantes na neutralização de ERO, também conferem às NpCeO₂ capacidade de modular a inflamação (Corsi et al., 2023).

Machhi et al. (2022) investigaram as propriedades anti-inflamatórias de NpCeO₂ esféricas dopadas com európio e revestidas com lipídeo, com tamanho de 159 nm, em modelos experimentais *in vitro* de neuroinflamação em microglias da linhagem BV2. Os resultados mostraram que essas NpCeO₂, na concentração de 100 ng/mL, reduziram significativamente as atividades inflamatórias de células BV2 previamente ativadas com LPS (0,5 μg/mL). Foi observada uma diminuição expressiva na produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1β e TNF-α, além de uma neutralização da expressão de óxido nítrico (NO). Os autores sugerem que o efeito anti-inflamatório das NpCeO₂ pode ser atribuído à sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e modular a resposta imune das células.

Kurtuldu et al. (2021) trabalharam com NpCeO₂ de vidro bioativas mesoporosas, com tamanhos variando entre 100 e 200 nm, e demonstraram um notável efeito anti-inflamatório em células de macrófagos RAW 264.7. Para isso, os autores induziram o processo inflamatório por LPS (1 μg/mL) e trataram as células com 50 μg/mL de NpCeO₂. Os resultados demonstraram uma redução significativa na liberação de óxido nítrico, um

marcador chave de inflamação. Selvaraj et al. (2015) realizaram um estudo com RAW 264.7, estimulando a inflamação com LPS (2 μg/mL) e posteriormente aplicando o tratamento com concentração de 1 μg/mL. Os resultados demonstraram que o tratamento reduziu significativamente os níveis de ERO, comparáveis aos efeitos da n-acetilcisteína, e suprimiram a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6 e IL-1β, de maneira dose-dependente. Além disso, as nanopartículas diminuíram a produção de nitrito, bem como os níveis de proteínas Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e Ciclooxigenase-2 (COX-2), marcadores cruciais do processo inflamatório.

Serebrovska et al. (2017) utilizaram NpCeO₂ mobilizadas na superfície de nanopartículas de sílica, de 220 nm, para avaliar o efeito anti-inflamatório e antioxidante dessas nanopartículas em um modelo de pneumonia experimental em ratos *Wistar*. A indução de inflamação foi realizada com a injeção intraperitoneal de LPS (1 mg/kg) e posteriormente os animais foram tratados com nanopartículas a 0,6 mg/kg através de um cateter orogástrico. O tratamento demonstrou um potencial significativo na modulação das atividades inflamatórias, principalmente pela redução do estresse oxidativo e da expressão de citocinas pró-inflamatórias, pois os resultados demonstraram uma diminuição significativa na expressão de TNF-α, IL-6 e de Quimiocina Ligante do Receptor CXC 2 (CxCL2).

Esses estudos demonstram que as nanopartículas de óxido de cério possuem um potencial significativo na modulação da inflamação, com ação em diferentes modelos experimentais e condições inflamatórias.

3.4 PROPRIEDADES CICATRIZANTES

A definição de ferida pode ser considerada como a ruptura da integridade da pele, das superfícies mucosas ou de tecidos orgânicos. Elas podem ocorrer por patologias, fatores acidentais ou intencionais. Cicatrização é o processo biológico que restaura a integridade da pele, mucosas ou tecidos após a lesão. O processo de cicatrização das feridas é dividido em quatro fases: hemostasia, que interrompe o sangramento com a formação de um coágulo; inflamação, que limpa o local da ferida e prepara o ambiente para a regeneração; proliferação, onde novos tecidos e vasos sanguíneos se formam; e remodelação, que organiza e fortalece o tecido recém-formado, tornando a ferida mais resistente ao longo do tempo (Singh et al., 2017).

Os principais desafios no processo de cicatrização de feridas incluem infecção, comprometimento da circulação sanguínea, condições subjacentes como diabetes e imunossupressão, envelhecimento, estresse oxidativo e a formação excessiva de tecido cicatricial, como os queloides. Além disso, a desnutrição pode retardar a recuperação, prejudicando a regeneração dos tecidos e prolongando o tempo de cicatrização (Whittam et al., 2016). Portanto, o desenvolvimento de novos dispositivos que auxiliem nesse processo é de extrema importância para contornar essas barreiras e melhorar os resultados terapêuticos, promovendo uma cicatrização mais eficaz e acelerada.

Nesse contexto, as NpCeO₂ destacam-se como uma ferramenta promissora para aprimorar o processo de cicatrização de feridas. Suas propriedades antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatórias contribuem significativamente para acelerar e melhorar esse processo. Por meio de sua ação antioxidante, as NpCeO₂ podem mitigar os danos teciduais causados pelo estresse oxidativo, já que a produção descontrolada de ERO pode lesar as células, dificultar a cicatrização e prolongar o estado inflamatório. Além disso, sua atividade antibacteriana desempenha um papel crucial ao reduzir os riscos de infecção, criando um ambiente mais favorável para a regeneração tecidual (Chen et al., 2024; Yi et al., 2024).

Augustine et al. (2021) investigaram a utilização de um adesivo de hidrogel de gelatina metacriloil biodegradável incorporado com NpCeO2 em tratamentos de feridas crônicas, como úlceras diabéticas. Neste estudo, os resultados mostraram que os adesivos contendo as NpCeO2 esféricas de 11,6 nm, em concentrações variando de 0,5%, 1%, 2% e 4% p/p, promoveram uma proliferação celular significativamente maior que o controle em fibroblastos (3T3) e queratinócitos (HaCaT). Além disso, o mesmo estudo avaliou a cicatrização de feridas em ratos *Sprague Dawley* diabéticos. Para isso, induziu-se o diabetes pela administração de estreptozotocina (injeção intraperitoneal, 40 mg/kg) e após a confirmação do quadro patológico, quatro perfurações de 10 mm foram feitas na pele desses animais. Após a formação da ferida, os adesivos contendo NpCeO2 foram incorporados e sua eficácia foi analisada ao longo do tempo. Os resultados mostraram que o dispositivo promoveu uma repetelização significativamente mais espessa em comparação ao controle, sendo cerca de 30–40% maior.

Raja & Fathima (2018) investigaram a aplicação de um compósito de hidrogel de gelatina reticulada com genipina, contendo NpCeO₂ com dimensões entre 2,5 e 6,5 nm, em

modelos de cicatrização de feridas *in vitro* e *in vivo*. Nos estudos *in vitro*, os autores utilizaram o ensaio de ranhura em fibroblastos NIH-3T3 para avaliar o tempo de fechamento da ferida. Os resultados indicaram que o dispositivo promoveu uma migração celular cerca de 5% mais rápida em comparação ao controle. Para os estudos *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar, nos quais uma ferida de excisão aberta de 4 cm² foi criada nas costas dos animais. Como principal resultado, observou-se que os grupos tratados com o dispositivo contendo NpCeO₂ apresentaram cicatrização completa no 12º dia após a criação da ferida, enquanto o grupo controle alcançou o mesmo nível de cicatrização apenas no 14º dia.

Luo et al. (2023) investigaram o uso de hidrogéis de poli(2-hidroxietilmetacrilato)-quitosana dopados com NpCeO₂ no processo de cicatrização de feridas em ratos *Sprague-Dawley*. Para isso, feridas de 1 cm² foram induzidas nas costas dos animais, e o processo de cicatrização foi monitorado ao longo do tempo. Os resultados demonstraram que o grupo tratado com hidrogéis contendo NpCeO₂ apresentou uma taxa de contração da ferida significativamente superior, atingindo 98,5% de fechamento no último dia de análise, enquanto o grupo controle alcançou apenas 56%.

Dessa forma, o estudo das NpCeO₂ apresenta um vasto campo de possibilidades, especialmente no âmbito biomédico, onde suas propriedades físico-químicas únicas desempenham um papel importante em diversas atividades biológicas como a ação antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Cério

As NpCeO₂ com diferentes formatos, NCB e NCE, foram sintetizadas e cedidas gentilmente pelo Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais do Instituto de Química da UnB, sob a coordenação do Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno. As NpCeO₂ foram sintetizadas por meio do método de hidrólise alcalina e revestidas com citrato de sódio. As concentrações iniciais das NpCeO₂ foram de 5,2 mg/mL para NCB e 4,1 mg/mL para NCE.

4.2 Caracterização Físico-Química de NCB e NCE

O diâmetro hidrodinâmico médio (DH), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (PZ) de NCB e NCE foram determinados pelos métodos de espalhamento de luz

dinâmica (DLS) e dispersão de luz eletroforética (ELS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, ZEN3600, UK). As análises foram realizadas com um laser de hélio-neônio de 633 nm em um ângulo de 90° à temperatura de 25°C em cubetas de poliestireno para DH e PDI ou cubetas capilares curvas para PZ.

As amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção 1:10 (100 µL de NCB ou NCE e 900 µL de água ultrapura) para otimizar a intensidade do sinal. Para o estudo de estabilidade, as formulações foram armazenadas à temperatura de 4°C e caracterizadas por DLS e ELS a cada 14 dias por 70 dias após a síntese. Cada leitura foi realizada em triplicata.

Além disso, imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas foram obtidas para confirmar sua morfologia e dimensões. A síntese e caracterização das nanopartículas foram realizadas pelo Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno, que gentilmente forneceu as imagens de MET para este estudo.

4.3 Análise da Atividade Antibacteriana

Duas cepas de bactérias gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), e uma cepa de bactéria gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram utilizadas para investigar as propriedades antibacterianas de NCB e NCE por meio do ensaio de microdiluição em caldo.

A técnica de microdiluição em caldo consiste em avaliar o crescimento bacteriano com base na turvação do meio de cultura. Após incubação, o crescimento das bactérias resulta em aumento da densidade óptica ou turvação, enquanto a ausência de crescimento mantém o meio translúcido (Schug et al., 2020).

Dessa forma, as cepas bacterianas foram descongeladas e cultivadas em tubos falcon de 15 mL, ressuspendendo 200 µL da solução estoque contendo bactérias em 7 mL de meio Mueller-Hinton (Difco®, Becton, Dickinson and Company). A suspensão foi homogeneizada em um agitador orbital AO-370 (GEHAKA®, Brasil), a 150 rpm e 37°C por 24h. Após esse período, foi realizada a avaliação da proliferação celular através da detecção da turbidez em um uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, EUA) no comprimento de onda de 595 nm. Foram consideradas as suspensões ajustadas para um valor próximo a 1.

Em seguida, as cepas de bactérias foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as gram-negativas e 1:100 para a gram-positiva. Após a diluição, em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana diluída e 50 µL

de NCB ou NCE, resultando em concentrações finais variando de 20,3 a 2600 μg/mL para NCB e de 16 a 2050 μg/mL para NCE, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração que inibe completamente o crescimento bacteriano.

Foram utilizados formaldeído 0,4% (v/v) como controle positivo e água ultrapura estéril como controle negativo. Após 24h de tratamento, a inibição do crescimento bacteriano foi determinada pela leitura da densidade óptica em um uma leitora de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, EUA) a 595 nm.

A possível interferência de cor das NCB e NCE foi avaliada utilizando amostras contendo 50 µL das nanopartículas e 50 µL de meio Mueller-Hinton, denominadas como branco. Os valores de absorbância do branco foram descontados das absorbâncias das respectivas amostras. Os dados obtidos foram normalizados em relação ao controle negativo, considerado como 100% do crescimento bacteriano. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um com triplicatas técnicas, totalizando um n=6.

4.4 Cultura e Manutenção de Células de Mamíferos

Para os ensaios biológicos com células de mamíferos, foram utilizadas as linhagens de fibroblastos murinos NIH-3T3 (BCRJ *Code* 0191) e macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71TM). Ambas foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio DMEM de alta glicose (Dulbecco's Minimum Essential Medium with high glucose - DMEM, Gibco[®], EUA), suplementado com 1% de antibiótico-antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina e 0,25 μg/mL de anfotericina B (Gibco[®] Invitrogen[™], EUA). Além disso, o meio para NIH-3T3 foi suplementado com 10% (v/v) de soro de bezerro (Gibco[®] Invitrogen[™], EUA) e para RAW 264.7, 10% de soro fetal bovino (Gibco[®] Invitrogen[™], EUA). As células foram mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

4.5. Avaliação da Citotoxicidade

4.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) e Análise da Morfologia Celular

A fase inicial do estudo com células de mamíferos visou determinar a faixa segura de concentração de NCB e NCE. Para isso, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Ele se baseia na capacidade das enzimas mitocondriais ativas em células viáveis de reduzir o sal de tetrazólio MTT (amarelo) a formazan insolúvel (roxo), que pode ser quantificada

espectrofotometricamente após solubilização, indicando a atividade metabólica celular (Ghasemi et al., 2021).

Dessa forma, as linhagens celulares RAW 264.7 e NIH-3T3 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (1 x 10^4 células/poço) e cultivadas por 24h para aderência. Em seguida, as células receberam tratamentos por 24h com 200 μ L de NCB e NCE, previamente diluídos em meio de cultivo suplementado, em concentrações variando de 10,2 a 2600 μ g/mL e de 8 a 2050 μ g/mL, respectivamente.

Após a remoção dos tratamentos, as células foram lavadas 1x com 200 μL de PBS (Gibco® Invitrogen™, EUA) e, antes de adicionar a solução de MTT, o efeito de NCB e NCE na morfologia das células NIH-3T3 e RAW 264.7 foi examinado e registrado por microscopia de contraste de fase utilizando o sistema de imagem automatizado Invitrogen EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, EUA), com uma ampliação total de 200x e 600x, respectivamente. Após o registro fotográfico, as células foram incubadas com solução de MTT a 10% (0,5 mg/mL) (Gibco® Invitrogen™, EUA) em meio de cultivo suplementado (15 μL de MTT diluídos em 135 μL de meio de cultivo por poço) por 2h em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica, Brasil) foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância foi medida em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific, EUA) a 595 nm.

Os dados foram normalizados em relação ao controle negativo, que consistiu em células tratadas com meio de cultura contendo água ultrapura filtrada, o veículo das formulações de NCB e NCE. A concentração inibitória de 50% (IC50) foi calculada usando uma análise de regressão não linear de dose-resposta. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de determinações em triplicata de três experimentos independentes (n = 9/concentração). Para dar prosseguimento aos ensaios posteriores selecionou-se três concentrações das nanopartículas que não apresentaram citotoxicidade para ambas as linhagens por 24h (NCB).

4.5.2 Ensaio de Viabilidade em Tempo Real

Para avaliar o efeito a longo prazo de NCB, foi realizado o ensaio de viabilidade celular em tempo real nas linhagens RAW 264.7 e NIH-3T3 utilizando o kit reagente RealTime-Glo™ MT (Cat.# G9711, Promega), conforme instruções do fabricante. O experimento baseia-se na detecção da viabilidade celular por meio da geração de

luminescência. O pró-substrato (*MT Cell Viability*) se difunde para dentro das células onde é reduzido para formar um substrato, que sai da célula e reage com a enzima (*NanoLuc Enzyme*) no meio. Apenas células metabolicamente ativas conseguem reduzir o prósubstrato e a produção de luminescência é proporcional ao número de células vivas. Essa luminescência pode ser monitorada continuamente, permitindo avaliar a saúde celular sem interromper o experimento.

Para isso, ambas as linhagens foram plaqueadas em densidade de 1,5 x 10³ células por poço em microplacas de 96 poços, brancas e de paredes opacas (Kasvi, modelo K12-096, Brasil). Após 24h de incubação para aderência celular ao fundo dos poços, as células foram tratadas com 100 μL de NCB previamente diluído em meio de cultura completo, nas concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL. Em seguida, o pró-substrato (*MT Cell Viability Substrate*) e a luciferase modificada (*NanoLuc Enzyme*) foram equilibrados a 37°C e diluídos em meio de cultura celular na seguinte proporção: 996 μL de meio, 2 μL do substrato e 2 μL da enzima. A solução foi homogeneizada e, então, 100 μL da mistura de reagentes foi adicionado a cada poço imediatamente após a exposição ao tratamento.

As placas foram suavemente homogeneizadas e incubadas protegidas da luz. A intensidade de luminescência (RLU) foi medida 1h, 24h, 48h e 72h após a adição do reagente, utilizando um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) de determinações em triplicata de dois experimentos independentes (n = 6/concentração).

4.6 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA

4.6.1 Ativação de macrófagos RAW 264.7 por LPS

As propriedades antioxidante e anti-inflamatória de NCB foram investigadas utilizando as células RAW 264.7 ativadas por lipopolissacarídeo (LPS), conforme descrito em protocolos anteriores (Kurtuldu et al., 2021; Selvaraj et al., 2015). Após incubação das células em estufa por 24h a 37 °C, os tratamentos com NCB nas concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL foram aplicados. Decorrido 2h de pré-tratamento com NCB, LPS (1 μg/mL) foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por mais 22h. Macrófagos expostos apenas em meio de cultura completo e LPS foram usados como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente.

A morfologia dos macrófagos ativados por LPS e tratados com NCB foi registrada por microscopia de contraste de fase utilizando o sistema de imagem automatizado Invitrogen EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, EUA), com uma ampliação total de 200x.

4.6.2 Efeito protetor de NCB contra o estresse oxidativo

O nível de ERO foi determinado utilizando a sonda DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) (*Cellular ROS Assay Kit* - ab113851, Abcam, EUA). A sonda é clivada por esterases inespecíficas, convertendo o H2DCFDA em DCFDA, que, na presença de ERO intracelulares, é oxidado e se transforma na molécula fluorescente DCF.

Para a análise, os macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placas de 6 poços a uma densidade de 7 x 10⁵ células/poço. Após incubação de 24h a 37 °C, as células foram tratadas e, em seguida, lavadas por três vezes com 2 mL de PBS para a remoção dos tratamentos. Após as lavagens, 1mL de PBS foi adicionado a cada poço para a coleta celular por desagregação mecânica utilizando um raspador de células *(cell scraper)*. As células foram então centrifugadas a 3000 g por 5 minutos a 4 °C para a obtenção do *pellet* celular. As células foram ressuspendidas em 200 μL de PBS e incubadas com 100 μL de solução de H₂DCFDA (40 μM) durante 30 minutos, protegidas da luz, à 37 °C.

A análise foi realizada utilizando um citômetro de fluxo Accuri™ C6 (Becton Dickinson, EUA). A dispersão frontal (FSC) e a dispersão lateral (SSC) das partículas foram medidas simultaneamente e os debris celulares foram excluídos. Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados no canal FL1 (530 nm). Dois experimentos foram realizados de forma independente, com triplicatas técnicas, totalizando n = 6. A análise foi realizada utilizando o software FlowJo® vX 0.7.

4.6.3 Dosagem de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico foram avaliados através da reação colorimétrica de Griess (Kit de Reagente de Griess - G2930 - Promega, EUA). O princípio do ensaio colorimétrico de Griess baseia-se na detecção indireta de óxido nítrico (NO) por meio da quantificação de nitritos (NO²-), que são produtos estáveis da oxidação do NO em solução. No método, o nitrito reage com os reagentes do kit (sulfanilamida e N-(1-naftil)etilenodiamina) formando um composto azo, que apresenta coloração rosa. A intensidade da cor, medida por espectrofotometria em 540 nm, é proporcional à concentração de nitrito na amostra. Para isso, células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de 1 x 10⁴ células por poço.

Após a exposição aos tratamentos, 50 μL do sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para uma nova microplaca de 96 poços. O reagente de Griess foi preparado pela mistura de 50 μL do Reagent A (ácido sulfanilâmido) e 50 μL do reagente B (N-(1-naftil)etilenodiamina diidrocloridrato). Posteriormente, 100 μL dessa solução foi adicionada às amostras, e misturadas suavemente para garantir a boa distribuição do reagente. A reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz.

Após a incubação, a absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific, EUA). Os dados foram normalizados em relação ao controle positivo. Dois experimentos foram realizados de forma independente, com triplicatas técnicas, totalizando n = 6.

4.6.4 Dosagem de citocinas

A dosagem de IL-6 (*E-EL-M0044*), IL-10 (*E-EL-M0046*), TNF-α (*E-EL-M3083*) murinas foi determinada utilizando kits de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Sandwich específicos (Elabscience, EUA). O ensaio ELISA sandwich baseia-se na utilização de anticorpos específicos para capturar e detectar as citocinas alvo nas amostras. Para isso, células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de 1 x 10⁴ células por poço, após 24h adicionou-se os tratamentos. Em seguida, em outra microplaca de 96 poços revestidas previamente pelo fabricante com os anticorpos de captura específicos para cada citocina (IL-6, IL-10 e TNF-α) adicionou-se 100 μL do sobrenadante coletado das amostras nos poços da microplaca, que foi incubada a 37 °C por 90min para permitir a captura das citocinas pelos anticorpos de captura. Após essa incubação, 100 µL de solução de trabalho (Biotinylated Detection Ab) foram adicionadas e incubadas por mais 60min a 37°C. Os pocos foram lavados 3x com 350 µL de solução tampão (wash buffer) para remover as substâncias não ligadas e 100 µL de anticorpo secundário conjugado à enzima (HRP Conjugate working solution) foi adicionado a cada poço. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 30min. Após essa incubação, as placas foram lavadas novamente 5x com 350 µL de solução tampão (wash buffer) para remover o excesso de anticorpo secundário. Para a detecção das citocinas, 90 µL de solução de substrato (Substrate Reagent) foi adicionado em cada poço, incubadas por 15min a 37°C e protegidas da luz. Posteriormente, a reação foi interrompida com 50 µL de solução de parada (Stop Solution).

Por fim, a absorbância das amostras foi medida em um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific, EUA) a 450 nm. Os valores obtidos foram



comparados com uma curva padrão. Cada citocina foi analisada de forma independente, com triplicatas técnicas, totalizando n = 3.

4.7 Análise do Potencial Cicatrizante

Para avaliar o potencial cicatrizante de NCB, foi realizado o ensaio de ranhura (scratch assay) com células NIH-3T3. Esse método é utilizado para avaliar a proliferação e migração celular. O princípio consiste em criar uma abertura semelhante a uma ferida em uma monocamada celular e monitorar o fechamento dessa área ao longo do tempo (Moreira et al., 2022).

Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços na densidade de 1,5 x 10⁵ células por poço e cultivadas até formarem uma monocamada celular confluente. Após a remoção do meio de cultura, realizou-se manualmente um risco nas monocamadas com uma ponteira plástica de 200 µL em linha reta.

Em seguida, os poços foram lavados 1x com 1mL de PBS e expostos ao tratamento com NCB (10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL). Células tratadas apenas com meio e água ultrapura foram usadas como controle. Imagens representativas do processo de proliferação e migração celular foram registradas por microscopia de contraste de fase utilizando o sistema de imagem celular automático Invitrogen EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, EUA) imediatamente após a realização da ferida e a exposição aos tratamentos para definição da área inicial. Novos registros foram realizados após 24h e 48h. As imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ. O ensaio foi realizado com uma triplicata técnica para cada concentração, totalizando um n=3. A redução percentual da área da ferida foi determinada a partir da fórmula demonstrada por Moreira et al. (2022):

Porcentagem de fechamento da ferida =
$$100\% - \frac{(\acute{a}rea\ final\)}{\acute{a}rea\ inicial} \times 100$$

4.8 Análise Estatística

As análises dos dados foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad software, EUA). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas com testes estatísticos específicos, com base nos resultados do teste de normalidade e nas premissas avaliadas. Os detalhes dos testes serão apresentados na seção de Resultados. Todos os



valores foram expressos como média ± desvio padrão. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização Físico-Química de NCB e NCE

Na Tabela 1 e a Figura 1 são apresentadas as características físico-químicas de NCB determinadas por DLS e ELS ao longo de 70 dias após a síntese. Os resultados indicam que o DH foi de 85,78 ± 3,22 nm e o PDI foi de 0,24 ± 0,02. O PZ de -53,42 ± 12,08 mV apresentou variações ao longo do período de análise, no entanto, somente no 42º dia observou-se uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o primeiro dia, com uma diminuição de 76%.

Tabela 1. Análises do diâmetro hidrodinâmico médio (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) de NCB a partir de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e dispersão de luz eletroforética (ELS).

	DH (nm)	PDI	PZ (mV)
NCB	85,78 ± 3,22	$0,24 \pm 0,02$	-53,42 ± 12,08

Os resultados apresentados correspondem à média obtida a partir de três medições independentes (n = $3 \pm DP$).

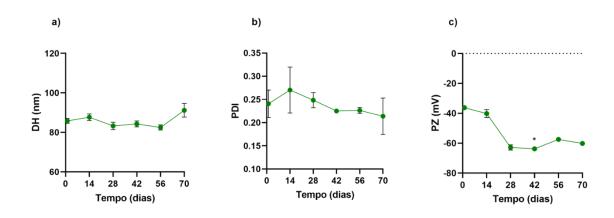


Figura 1. Avaliação da estabilidade de NCB durante 70 dias após a síntese. Os gráficos representam a) o diâmetro hidrodinâmico médio (DH), b) o índice de polidispersão (PDI) e c) o potencial zeta (PZ). A análise estatística foi realizada por ANOVA One-Way, seguida do pós-teste de Tukey para avaliação do DH e do PDI. Para a análise do PZ, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao primeiro dia de análise, onde, *P<0,05. Todos os dados foram apresentados como média ± DP.

A Tabela 2 e a Figura 2 apresentam as características físico-químicas de NCE, determinadas por DLS e ELS por 70 dias após a síntese. Os resultados indicam que o DH de NCE foi de $140,06 \pm 11,2$ nm. Observou-se uma redução significativa do DH a partir do 28° dia após a síntese, com o valor passando de $153,1 \pm 2,7$ nm (1° dia) para $134 \pm 2,4$ nm (28° dia). Entre o 28° e o 70° dia, não foram observadas diferenças significativas. O PDI apresentou um valor médio de $0,35 \pm 0,05$ e o seu comportamento seguiu uma tendência semelhante à do DH, passando de $0,41 \pm 0,02$ (1° dia) para $0,32 \pm 0,03$ (28° dia) e depois manteve a estabilidade. O PZ apresentou um valor médio de $-55,23 \pm 10,47$ ao longo do período analisado, exceto no 14° dia em que se registrou um valor de $-24,19 \pm 1,79$. Apesar dessa variação, em nenhum dia houve diferença estatística em relação ao primeiro dia de análise.

Tabela 2. Análises do diâmetro hidrodinâmico médio (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) de NCE a partir de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e dispersão de luz eletroforética (ELS).

	DH (nm)	PDI	PZ (mV)	
NCE	140,06 ± 11,2	0,35 ± 0,05	-55,23 ± 10,47	

Os resultados apresentados correspondem à média obtida a partir de três medições independentes (n = $3 \pm$ DP).

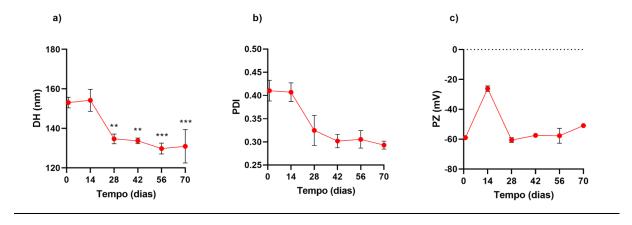


Figura 2. Avaliação da estabilidade de NCE durante 70 dias após a síntese. Os gráficos representam a) o diâmetro hidrodinâmico médio (DH), b) o índice de polidispersão (PDI) e c) o potencial zeta (PZ). A análise estatística foi realizada por ANOVA One-Way, seguida do pós-teste de Tukey para avaliação do DH. Para a análise do PDI e PZ, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao primeiro dia de análise, onde, **P<0,01 e ***P<0,001. Todos os dados foram apresentados como média ± DP.

Além disso, as imagens de MET (Figura 3), cedidas gentilmente pelo Dr. Leonardo Giordano Paterno, confirmam a diferença morfológica entre as nanopartículas analisadas. As NCB apresentam uma morfologia alongada, semelhante a um bastão, enquanto as NCE exibem uma morfologia predominantemente esférica.

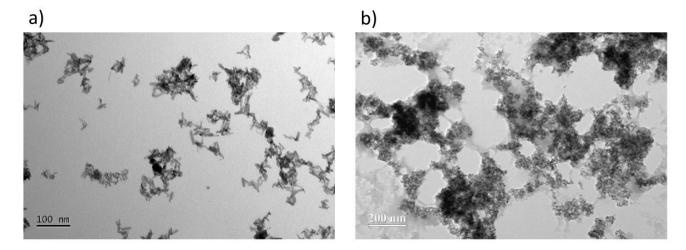


Figura 3. Análise da morfologia de NCB (a) e NCE (b) visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Escala NCB: 100 Nm. Escala NCE: 200 nm.

5.2 Atividade Antibacteriana

Nenhuma das concentrações testadas de NCB e NCE foi capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, impossibilitando a determinação das CIM. Como esperado, em todos os casos, o controle positivo reduziu o crescimento das bactérias em mais de 99%. No entanto, determinadas concentrações de NCB e NCE promoveram uma inibição expressiva do crescimento das cepas bacterianas analisadas, conforme mostrado na Figura 4.

A NCB apresentou efeitos antibacterianos distintos entre as diferentes linhagens bacterianas. Para *S. aureus* (Fig. 4a), observou-se que concentrações ≥ 40,6 ug/mL inibiram, de maneira similar, cerca de 50% do crescimento. No caso de *E. col*i (Fig. 4c), a inibição foi menor, com uma redução máxima de cerca de 37% na concentração de 650 µg/mL. Para *P. aeruginosa* (Fig. 4e), observou-se uma discreta redução do crescimento bacteriano entre 81,3 e 650 µg/mL, na faixa de 40-45%, porém, sem significância estatística. Assim, os dados indicam que a NCB apresenta um efeito antibacteriano mais evidente contra *S. aureus*, sendo menos eficaz contra *E. coli*, e *P. aeruginosa*.

Por outro lado, a NCE demonstrou uma atividade antibacteriana mais pronunciada do que a NCB. Para *S. aureus* (Fig. 4b), o crescimento foi reduzido de forma significativa nas concentrações mais altas de 1025 e 2050 μg/mL, indicando um efeito inibitório significativo de 91%. Em *E. coli* (Fig. 4d), observou-se uma diminuição significativa do crescimento, de aproximadamente 50%, nas concentrações de 512,5 e 1025 μg/mL. Para *P. aeruginosa* (Fig. 4f), verificou-se uma redução do crescimento bacteriano, de aproximadamente 50%, nas concentrações de 256,3 a 1025 μg/mL.

Notavelmente, para todas as cepas gram-negativas, NCB e NCE apresentou um crescimento bacteriano superior a 100% na maior concentração testada (2600 μ g/mL.para NCB e 2050 μ g/mL de NCE).

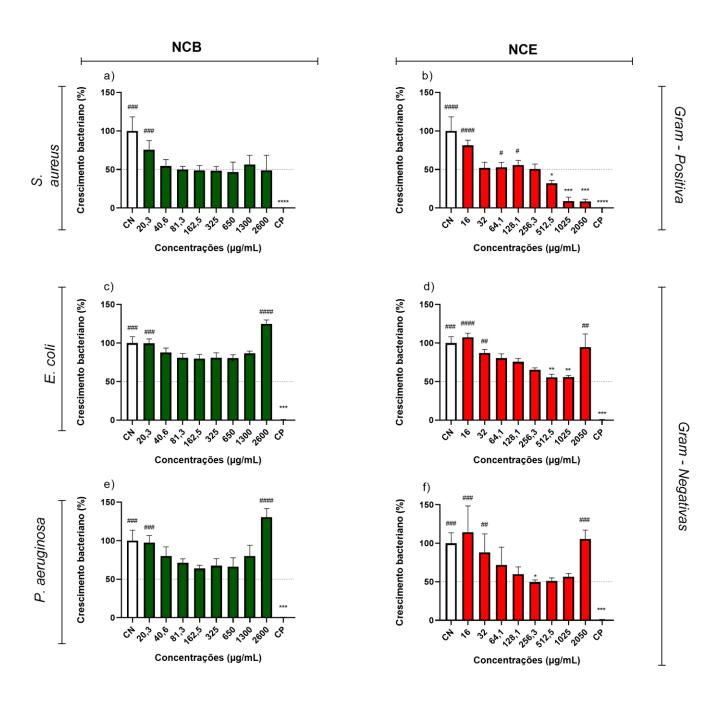


Figura 4. Crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* (a,b), *Escherichia coli* (c,d) e *Pseudomonas aeruginosa* (e,f) mediante ao tratamento com diferentes concentrações de NCB e NCE por 24h. Diferenças significativas foram detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05 entre os tratamentos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo (CN: água ultrapura estéril), onde, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. As cerquilhas indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle positivo (CP: formaldeído 0,4%), onde, #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 e ####P<0,0001. Todos os dados foram apresentados como média ± DP (n=6).

5.3 Avaliação da Citotoxicidade

5.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A Figura 5 revela o impacto das diferentes concentrações de NCB e NCE na viabilidade celular das linhagens RAW 264.7 e NIH-3T3.

Nas Fig. 5a e Fig. 5b é possível observar que a linhagem RAW 264.7 apresentou respostas distintas à exposição às nanopartículas NCB e NCE, demonstrando maior sensibilidade às NCE. Para NCB (Fig. 5a), as concentrações de 10,2 a 81,3 μg/mL mantiveram a viabilidade de RAW 264.7 próxima aos valores do controle, com viabilidade superior a 90%. Embora a concentração de 162,5 μg/mL não tenha apresentado diferença estatística em relação ao controle, houve uma redução de 22% na viabilidade dos macrófagos. A partir de 325 μg/mL, a viabilidade celular diminuiu significativamente, com reduções progressivas conforme o aumento da concentração, atingindo valor inferior a 40% na maior concentração testada (2600 μg/mL).

Para NCE (Fig. 5b), todas as concentrações testadas demonstraram toxicidade para RAW 264.7. Embora as concentrações de 8 a 64,1 μg/mL não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas em relação ao controle, resultaram em uma viabilidade celular inferior a 60%. Com o aumento da concentração, observou-se uma redução ainda mais acentuada, atingindo valores inferiores a 15% de viabilidade celular na maior concentração testada (2050 μg/mL).

Nas figuras Fig. 5c e Fig. 5d, também foi possível observar uma diferença na viabilidade das células NIH-3T3 após a exposição a diferentes concentrações de NCB e NCE. Assim como as células RAW 264.7, as NIH-3T3 demonstraram maior tolerância à presença de NCB. Em concentrações de 10,2 a 325 μg/mL de NCB, a viabilidade celular permaneceu acima de 80%. Entretanto, nas concentrações mais elevadas (650 a 2600 μg/mL), houve uma redução significativa da viabilidade, diminuindo progressivamente com o aumento da concentração e atingindo valor inferior a 25% na maior dose testada (Fig. 5c).

Quanto à exposição ao NCE, as NIH-3T3 apresentaram uma resposta mais favorável em comparação com as RAW 264.7, apresentando menor citotoxicidade. Enquanto concentrações de 8 a 256,3 μg/mL mantiveram a viabilidade celular em níveis superiores a 85%, as concentrações ≥ 512,5 μg/mL resultaram em toxicidade significativa em relação ao controle, com a concentração de 2050 μg/mL reduzindo a viabilidade para menos de 20% (Fig. 5d).

Conforme mostrado na Tabela 3, a NCB apresentou um IC $_{50}$ de 1176 µg/mL para RAW 264.7 e de 992,4 µg/mL para NIH-3T3. Para a NCE, o IC $_{50}$ foi de 45,6 µg/mL para RAW 264.7 e 406,3 µg/mL para NIH-3T3.

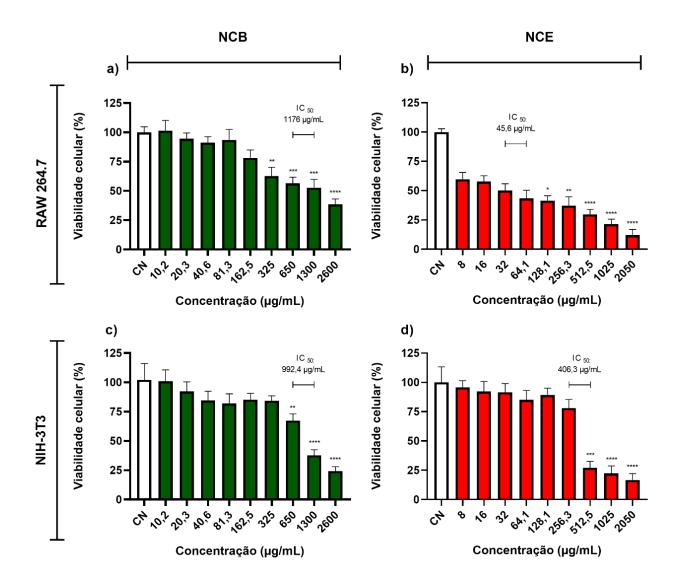


Figura 5. Viabilidade celular de RAW 264.7 e de NIH-3T3 mediante a diferentes concentrações de NCB (a e c) e de NCE (b e d) ao longo de 24h. Diferenças significativas foram detectadas por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas comparadas ao controle negativo (CN), onde, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. Todos os dados foram apresentados como média ± DP (n=9).

Tabela 3. Concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) de NCB e NCE em RAW 264.7 e NIH-3T3.

	NCB	NCE
RAW 264.7	1176 μg/mL	45,6 μg/mL



NIH-3T3	992,4 μg/mL	406,3 μg/mL
---------	-------------	-------------

Os valores de IC $_{50}$ foram determinados por regressão não linear, com base na análise logarítmica normalizada (log (inhibitor) vs. normalized response-variable slope). RAW 264.7 NCB ($r^2 = 0.87$), NIH-3T3 NCB ($r^2 = 0.85$), RAW 264.7 NCE ($r^2 = 0.88$) e NIH-3T3 NCE ($r^2 = 0.89$).

5.3.2 Análise da Morfologia Celular

Para representação do efeito de NCB na morfologia celular, foram selecionados os seguintes grupos experimentais: i - controles, ii - 81,3 μg/mL (a maior concentração usada nas análises posteriores sem efeitos citotóxicos evidentes) e iii - 1300 μg/mL para RAW 264.7 e 650 μg/mL NIH-3T3 (valor próximo ao IC₅₀ para as linhagens).

As imagens obtidas por microscopia, presentes na Figura 6, revelam que a concentração de 81,3 µg/mL causou alterações mínimas na morfologia celular. Observouse que as células apresentaram características semelhantes às do grupo controle, com RAW 264.7 mantendo o formato fusiforme ou arredondado com poucos prolongamentos e NIH-3T3 mantendo formato alongado e organizados em uma monocamada.

No entanto, a concentração de 1300 μg/mL resultou em alterações estruturais significativas para RAW 264.7, como retração de prolongamentos, presença de vacúolos, além de redução na densidade celular, indicando um efeito citotóxico severo. Já nas células NIH-3T3, a concentração de 650 μg/mL resultou em desorganização da camada celular, com presença de fragmentos e diminuição dos seus prolongamentos.

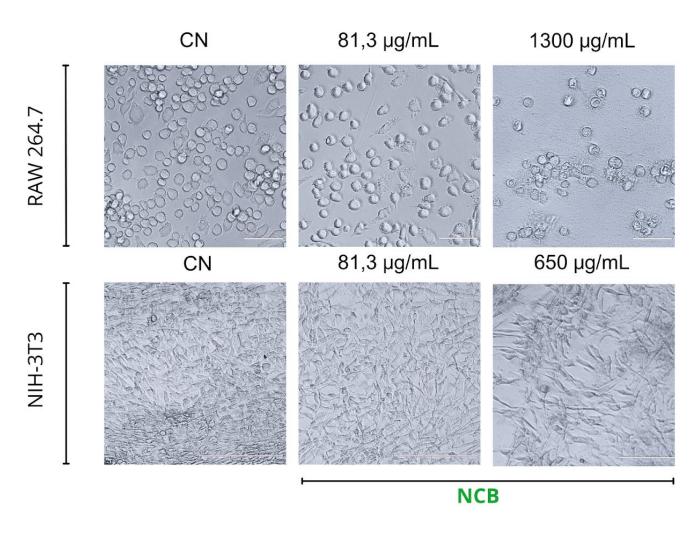


Figura 6. Análise da morfologia celular de RAW 264.7 e de NIH-3T3 após exposição a diferentes concentrações de NCB (81,3, 650, 1300 μg/mL) por 24h. Escala RAW: 600 μm. Escala NIH: 200 μm.

Para análise da morfologia celular em presença de NCE, foram selecionados os seguintes grupos experimentais: i - controles, ii - 8 μg/mL (menor concentração testada) e iii - 32 μg/mL para RAW 264.7 e 512,5 μg/mL NIH-3T3 (valor próximo ao IC₅₀ para as linhagens).

A análise das imagens microscópicas, presentes na Figura 7, revelou alterações significativas na morfologia celular, evidenciando efeitos dose-dependentes nas duas linhagens. Em RAW 264.7, as concentrações de 8 μg/mL e 32 μg/mL induziram uma redução da densidade celular de forma significativa e alterações estruturais visíveis, como o arredondamento e presença de vacúolos, quando comparadas ao controle.

Na linhagem NIH-3T3, a concentração mais alta, de 512 μg/mL, resultou em danos celulares acentuados, caracterizados pela fragmentação celular, causando um impacto tóxico severo, comprometendo a capacidade das células de manter sua adesão e estrutura.

Porém, a concentração de 8 μg/mL apresentou alterações morfológicas semelhantes ao controle.

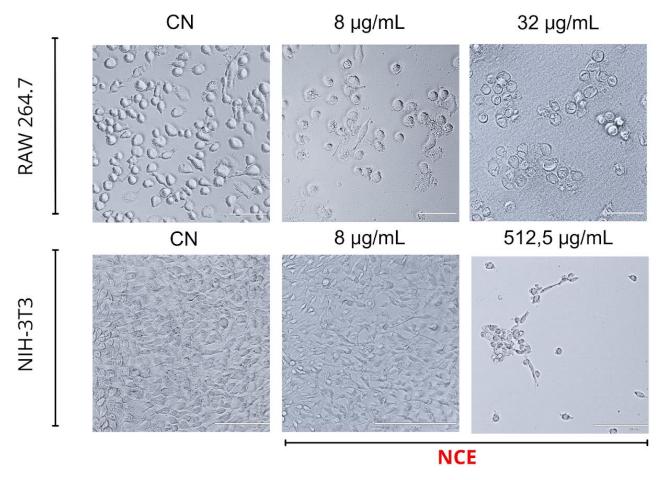


Figura 7. Análise da morfologia celular de RAW 264.7 e de NIH-3T3 após exposição a diferentes concentrações de NCE (8 μ g/mL para as duas e 32 μ g/mL para RAW 264.7 e 512,5 μ g/mL para NIH-3T3) por 24h. Escala RAW: 600 μ m. Escala NIH: 200 μ m.

5.3.3 Ensaio de Viabilidade em Tempo Real

A Figura 8 mostra a viabilidade de RAW 264.7 e NIH-3T3 ao longo de 72h de exposição às concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL de NCB. Na Fig. 8a, observa-se um aumento progressivo da viabilidade das células RAW 264.7 ao longo do tempo em todas as condições analisadas. Nas três concentrações, houve diferença estatística ao comparar os crescimentos nos estágios inicial (1h) e final (72h). Embora não tenha sido identificada diferença estatística entre as concentrações testadas e o controle, a exposição à concentração de 81,3 μg/mL por 72h resultou em uma viabilidade celular ligeiramente inferior, de 76%.

Na Fig. 8b, a viabilidade das células NIH-3T3 também aumentou progressivamente em todas as condições até as primeiras 48h. Após 48h, foi observada uma ligeira redução na viabilidade celular do grupo controle e uma e uma tendência de estabilização nos grupos tratados. O controle e a concentração de 10,2 μg/mL apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre 1h e os períodos de 48h e 72h. Por outro lado, as concentrações de 40,6 μg/mL e 81,3 μg/mL não demonstraram diferenças estatísticas em relação ao tempo inicial.

As concentrações de 10,2 e 40,6 µg/mL apresentaram um crescimento similar ao controle, com cerca de 100% da viabilidade em 72h, apenas a concentração de 81,3 µg/mL resultou em um decréscimo de 17%.

Inicialmente, ambas as linhagens celulares foram plaqueadas com a mesma densidade (1.5×10^3 células). No entanto, a taxa de proliferação do controle de NIH-3T3 foi superior à de RAW 264.7 ao longo do tempo. Após 24h, a proliferação da NIH-3T3 foi aproximadamente 170% maior. Esse aumento percentual reduziu-se para 147,39% em 48 horas e para 52,64% em 72 horas.

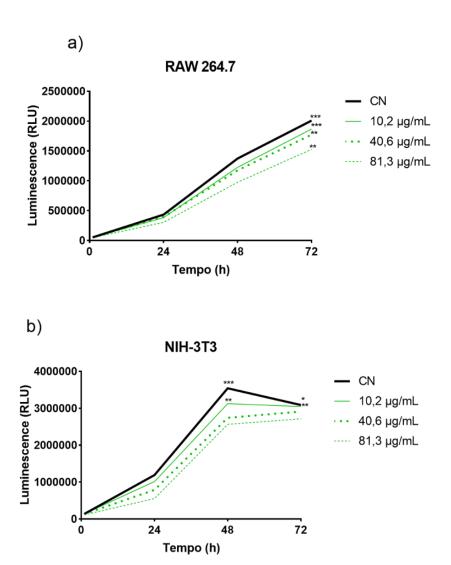


Figura 8. Viabilidade celular das linhagens (a) RAW 264.7 e (b) NIH-3T3 ao longo de 72h de exposição a diferentes concentrações NCB: 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL. A análise estatística foi realizada pelo teste de Friedman, seguido do pós teste de Dunn. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas, onde, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. Todos os dados foram apresentados como média (n=6).

5.4 Análise das propriedades antioxidante e anti-inflamatória

5.4.1 Efeito Protetor de NCB Contra o Estresse Oxidativo

Como esperado, os macrófagos (RAW 264.7) tratados com LPS apresentaram o dobro da intensidade de fluorescência do DCFDA em comparação ao controle negativo, indicando níveis aumentados de ERO. Em contrapartida, NCB reduziu significativamente os níveis de ERO em cerca de 35% comparado ao controle positivo. Esses resultados estão apresentados na Figura 9.

A análise morfológica (Fig. 10) também sugere o efeito protetor de NCB contra o estresse oxidativo. As células desafiadas exibiram alterações morfológicas evidentes, incluindo maior aderência celular, elongação e presença de múltiplas projeções citoplasmáticas, características associadas à ativação macrofágica induzida pelo estímulo inflamatório. Nos grupos tratados com NCB, a morfologia das células se aproximou do estado basal (macrófagos não ativados).

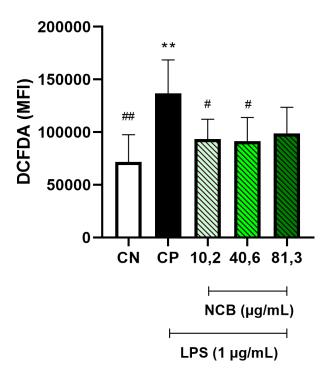


Figura 9: Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células RAW 264.7 após exposição a NCB por 24h e LPS por 22h. O grupo CN representa o controle negativo (células tratadas apenas com meio de cultura e água ultrapura) e o grupo CP representa o controle positivo (células tratadas com 1 μg/mL de LPS). Os grupos tratados com NCB foram expostos a concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL por 24h. Os níveis de ERO foram avaliados por meio da intensidade de fluorescência mediana do marcador DCFDA. A análise estatística foi realizada por ANOVA One-Way, seguida do pós teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao CN, onde, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. As cerquilhas indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao CP, onde, #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 e ####P<0,0001. Todos os dados foram apresentados como média ± DP (n=6).

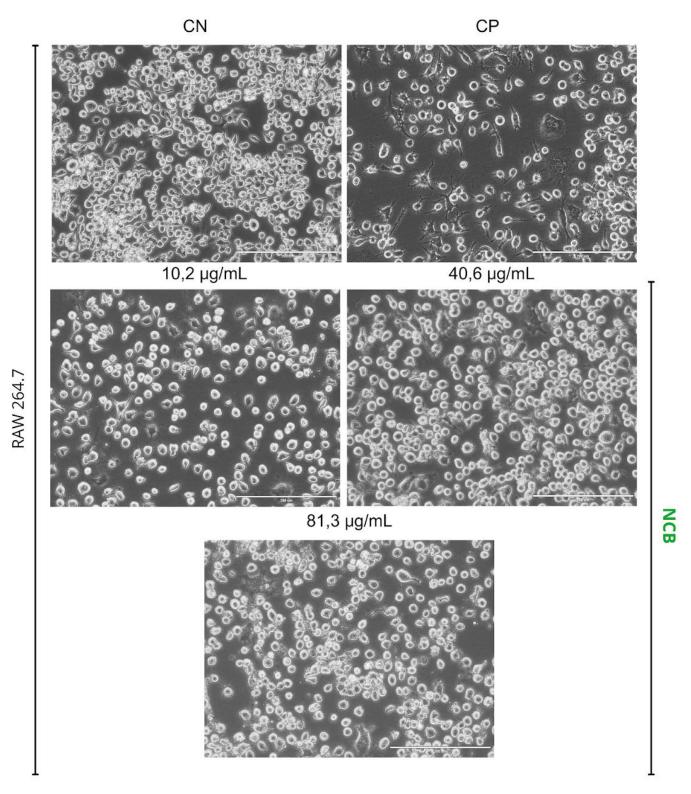


Figura 10: Morfologia representativa do efeito protetor de NCB contra o estresse oxidativo em macrófagos RAW 264.7 ativados por lipopolissacarídeo (LPS). O grupo CN representa o controle negativo (células tratadas apenas com meio de cultura e água) e o grupo CP representa o controle positivo (células tratadas com 1 μg/mL de LPS). Os grupos tratados com NCB foram expostos a concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL. Escala: 200 μm.

5.4.2 Dosagem de Óxido Nítrico

De acordo com a Figura 11, o grupo ativado por LPS exibiu uma absorbância 240% maior que o controle negativo, refletindo uma indução robusta de óxido nítrico em resposta ao estímulo inflamatório. Nos grupos tratados com NCB, houve uma redução de óxido nítrico para os níveis basais (similar ao controle negativo).

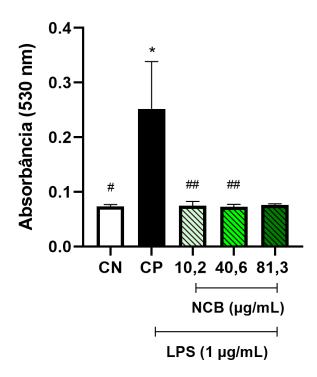


Figura 11: Efeito inibitório de NCB sobre a produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS. O grupo CN representa o controle negativo (células tratadas apenas com água) e o grupo CP representa o controle positivo (células tratadas com 1 μg/mL de LPS). Os grupos tratados com NCB foram expostos a concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL. A produção de óxido nítrico foi avaliada por meio do ensaio de Griess, com leituras de absorbância de 530 nm. A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao CN, onde, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. As cerquilhas indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao CP, onde, #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 e ###P<0,0001. Todos os dados foram apresentados como média ± DP (n=6).

5.4.3 Dosagem de Citocinas

A Figura 12 mostra que a concentração de 81,3 μg/mL de NCB reduziu em 26%, 48% e 15% os níveis de TNF-α, IL-6 e IL-10, respectivamente, em relação ao controle positivo. Já as concentrações de 10,2 e 40,6 μg/mL não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo positivo.

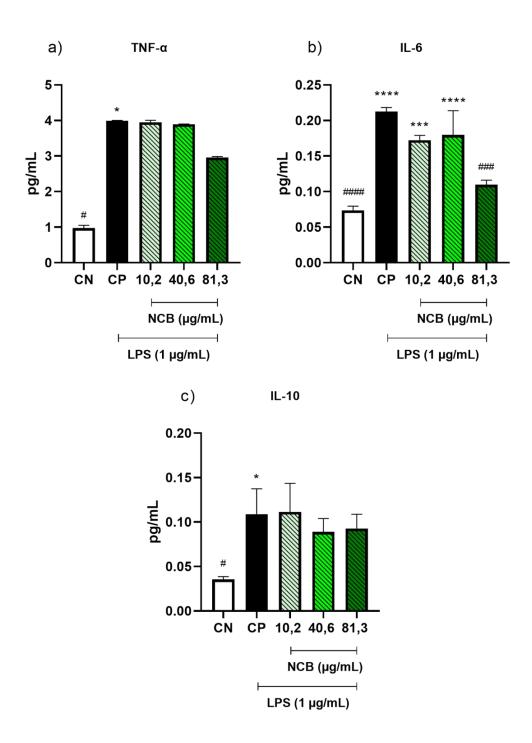


Figura 12: Efeito inibitório de NCB sobre a produção de TNF-α, IL-6 e IL-10 em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS. O grupo CN representa o controle negativo (células tratadas apenas com água ultrapura) e o grupo CP representa o controle positivo (células tratadas com 1 μg/mL de LPS). Os grupos tratados com NCB foram expostos a concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL. A produção de citocinas foi avaliada por meio do ensaio de ELISA *sandwich*, com leituras de absorbância de 540 nm. A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para TNF-α e por ANOVA One-Way, seguida do pós teste de Tukey para IL-6 e IL-10. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao CN, onde, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e *****P<0,0001. As



cerquilhas indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao CP, onde, #P<0,05, ##P<0,01, ##P<0,001 e ###P<0,0001. Todos os dados foram apresentados como média \pm DP (n=3).

5.5 Análise da Atividade Proliferativa

A recuperação da ferida em células de fibroblastos NIH-3T3 (Figura 13) foi de aproximadamente 38% no grupo controle em 24h, enquanto nas células tratadas com NCB nas concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 µg/mL, as taxas de recuperação foram de 56%, 28% e 37%, respectivamente. Esses resultados indicam que a concentração mais alta de NCB apresentou uma taxa de proliferação e migração similar ao controle, já a concentração mais baixa resultou em um aumento de cerca de 18% na recuperação da ferida em relação ao controle.

Após 48h, observou-se que o fechamento da ferida foi maior em todas as condições testadas comparadas ao controle. O grupo controle apresentou 80% de fechamento, enquanto as concentrações de 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL alcançaram taxas de 95%, 93% e 90%, respectivamente. Apesar de não haver diferença estatística, a concentração de 10,2 μg/mL resultou em uma taxa média de fechamento de ferida 15% superior ao controle.

A Figura 14 evidencia o potencial cicatrizante de NCB com imagens representativas do ensaio de ranhura realizado com NIH-3T3. As imagens mostram a área da ferida sem tratamento (controle) e após o tratamento com NCB em diferentes concentrações, avaliadas em intervalos de 0, 24 e 48h.

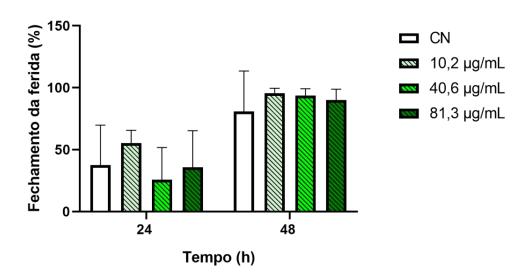


Figura 13: Cicatrização de feridas em modelo *in vitro* com fibroblastos murinos NIH-3T3 ao longo de 48h, após exposição a diferentes concentrações NCB: 10,2, 40,6 e 81,3 μg/mL. A análise estatística foi realizada pelo teste de Friedman, seguido do pós teste de Dunn. Foram consideradas diferenças significativas p<0,05. Todos os dados foram apresentados como média ± DP (n=3).

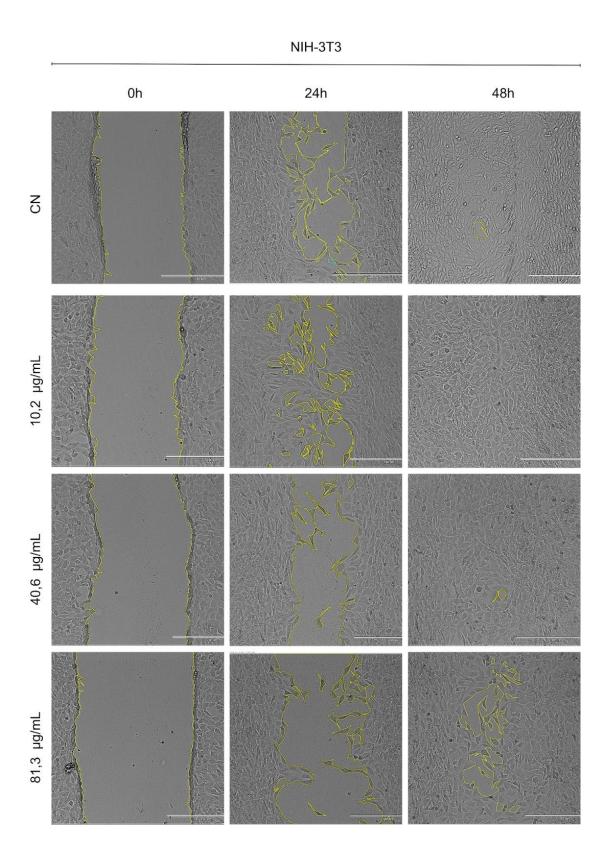




Figura 14. Imagens representativas do ensaio de ranhura com fibroblastos murinos (NIH-3T3), mostrando a área da ferida sem tratamento (controle) e após o tratamento com NCB em diferentes concentrações, avaliadas após 24 e 48h.

6. DISCUSSÃO

Nanopartículas de óxido de cério podem ser sintetizadas por diversas rotas, como precipitação, sol-gel, hidrólise, pirólise, sonoquímica, microemulsão e hidrotermal. Cada rota tem influência no tamanho, formato, proporção entre Ce³+/Ce⁴+ e estabilidade. O método utilizado para síntese de NCB e NCE, a hidrólise alcalina, permite o controle de formato e proporção entre Ce³+/Ce⁴+ apenas ajustando a quantidade de base utilizada (Nyoka et al., 2020).

Com o objetivo de garantir a biocompatibilidade e a segurança das nanopartículas para aplicações biológicas, a síntese realizada permitiu purificação simples e eficaz com a lavagem das nanopartículas com água ultrapura para eliminação dos materiais de partida que não reagiram e têm potencial tóxico. Além disso, visando aumentar a estabilidade coloidal, NCB e NCE foram funcionalizadas com citrato de sódio, utilizando o método simples de agitação em temperatura ambiente. O citrato de sódio, utilizado como agente estabilizador, conferiu carga negativa às partículas, promovendo repulsão eletrostática e evitando a agregação (Cândido et al., 2024; De Sá et al., 2015). Esse revestimento pode ter auxiliado na melhora da estabilidade, no controle do tamanho das nanopartículas e na redução da citotoxicidade, aumentando a biocompatibilidade das NCB e NCE. Dessa forma, NCB e NCE surgem como alternativas promissoras para uma ampla gama de aplicações biológicas. A síntese por hidrólise alcalina não apenas permite o controle da estabilidade coloidal e da biocompatibilidade por meio da funcionalização com citrato de sódio, mas também possibilita o ajuste preciso da proporção entre os estados Ce³+ e Ce⁴+. Esse controle dos estados de oxidação contribui para a melhora da atividade antioxidante, da estabilidade e da eficácia terapêutica das nanopartículas. Com esses avanços, as NCB e NCE abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias baseadas em NpCeO₂. Com base nessas promissoras possibilidades, prosseguimos com as análises do potencial da nanopartícula desenvolvida, avaliando tanto suas possíveis aplicações biológicas quanto sua segurança, a fim de garantir a viabilidade de seu uso em terapias futuras.

Sendo assim, os resultados da caracterização físico-química e a análise da estabilidade de NCB e NCE indicaram que as formulações permaneceram estáveis ao longo de 70 dias, mantendo seus parâmetros de DH, PDI e PZ, com poucas variações.

O DH das nanopartículas é um parâmetro dependente de diversos fatores, incluindo o método de síntese, a composição, o revestimento e as condições experimentais, dificultando comparações diretas entre os estudos. O DH de NCB (85,78 ± 3,22 nm) e de NCE (140,06 ± 11,2 nm) encontram-se dentro da faixa apropriada para aplicações biológicas. Por exemplo, o estudo de Akhtar et al. (2021) demonstrou NpCeO₂ com DH de 138 ± 67 nm não induz toxicidade em células HUVEC, preserva o potencial de membrana mitocondrial e reduz os níveis de ERO e NO. De forma semelhante, Jahan et al. (2024) estudaram NpCeO₂, cujos DH variaram de 44 nm a 141 nm, e observaram um efeito antioxidante significativo e viabilidade celular dependente da concentração.

Estudos prévios demonstraram que nanopartículas com carga positiva, incluindo NpCeO₂, têm maior citotoxicidade devido às interações intensas com membranas celulares negativas, enquanto cargas negativas ou neutras apresentam menor (toxicidade (Mortazavi et al., 2017; Shao et al., 2015). Portanto, NCB (-53,42 ± 12,08 mV) e NCE (-55,23 ± 10,47 mV) com PZ negativos são potencialmente biocompatíveis.

Com relação ao PDI de nanopartículas, valores ≤ 0,3, como os de NCB (0,24 ± 0,02) e NCE (0,35 ± 0,05), geralmente indicam boa homogeneidade, favorecendo a reprodutibilidade experimental, enquanto valores > 0,7 indicam heterogeneidade que pode impactar nos resultados biológicos (Mortazavi et al., 2017; Shao et al., 2015). Diante das evidências científicas, as propriedades físico-químicas de NCB e NCE foram consideradas adequadas para explorar potenciais aplicações biológicas.

Nesse contexto, a atividade antibacteriana de NCB e NCE foi avaliada neste estudo e observou-se variações na capacidade inibitória do crescimento de bactérias, com a NCE mostrando maior eficácia, especialmente contra *S. aureus*, e efeito menos expressivo contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. Possivelmente, esse resultado está associado ao tamanho das NpCeO₂. Embora nanopartículas de tamanho menores, como de NCB, possuam superfícies mais reativas, partículas de tamanho maiores, como NCE, podem ser mais eficazes devido à maior acessibilidade de suas áreas de superfície (Souza, 2016; Kuang et al., 2011).

Outro fator importante a ser considerado na avaliação da atividade antibacteriana é o formato das nanopartículas. Sehar et al. (2021) mostraram que NpCeO₂ cúbicas têm maior atividade antibacteriana do que as esféricas, com zonas de inibição maiores para *E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* e *S. aureus*. Os autores atribuíram a superioridade das nanopartículas cúbicas à maior área de superfície específica, que aumenta a interação com as células bacterianas.

Além disso, a carga de superfície também desempenha um papel crucial na atividade antibacteriana. Como mencionado anteriormente, nanopartículas com carga superficial positiva tendem a interagir de forma mais eficaz com as células, incluindo bactérias, que possuem cargas negativas devido à presença de LPS em gram-negativas e peptidoglicanos em gram-positivas. Essa interação eletrostática favorece a adesão das nanopartículas à superfície bacteriana, facilitando a penetração na membrana celular e potencializando a atividade antibacteriana (Farias et al., 2018). Alpaslan et al. (2017) demonstraram que NpCeO₂ carregadas positivamente mostraram uma interação mais intensa com as *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* comparadas às de carga negativa, promovendo maior adesão, penetração, alterações morfológicas e uma redução significativa no crescimento.

Embora não haja um consenso sobre o mecanismo bactericida das NpCeO₂, as evidências científicas sugerem que a interação direta com a parede bacteriana forma lesões estruturais que comprometem o transporte de nutrientes e o equilíbrio homeostático. Além disso, o microambiente ácido bacteriano favorece o efeito pró-oxidante das NpCeO₂ e o estresse oxidativo danifica lipídios, proteínas e DNA, levando à morte celular (Zhang et al., 2019; Jing et al., 2014; Ma et al., 2022; Ahmad et al., 2023). Dessa forma, os resultados observados neste estudo para as cepas *S. aureus, E. coli,* e *P. aeruginosa* podem ser explicados, pelo menos em parte, pela menor interação de NCB e NCE com as bactérias.

Para NCB e NCE, observou-se um aumento do crescimento bacteriano na maior concentração testada para as duas cepas gram-negativas testadas. Esse fenômeno pode ser atribuído à interação das nanopartículas com as células bacterianas. Em altas concentrações, as nanopartículas podem gerar um estresse excessivo nas células bacterianas, desencadeando respostas adaptativas que promovem a resistência. Esse estresse pode incluir a ativação de vias metabólicas ou mecanismos de reparo celular, que resultam em uma maior proliferação, já que as bactérias tentam compensar o dano causado e aumentar sua taxa de crescimento para garantir sua sobrevivência (Tsuji et al., 2016).

Diferente do efeito pró-oxidativo das NpCeO₂ nas bactérias, espera-se que em pH fisiológico básico elas atuem de forma mimética às enzimas antioxidantes (Ma et al., 2022) (Zhang et al., 2019). Por essa razão, hipotetizamos que NCB e NCE poderiam ser biocompatíveis com efeitos terapêuticos promissores. Assim, foram realizados experimentos *in vitro* para investigar a citotoxicidade e atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante.

As linhagens RAW 264.7 e NIH-3T3 foram selecionadas de acordo com os objetivos do estudo, uma vez que RAW 264.7 são amplamente empregados em investigações sobre processos inflamatórios e estresse oxidativo, enquanto NIH-3T3 são fundamentais para a regeneração tecidual e cicatrização (Augustine et al., 2021; Kurtuldu et al., 2021; Selvaraj et al., 2015; Raja & Fathima; 2018).

Inicialmente, foi realizado um ensaio de MTT para avaliar a resposta das células à presença de NCB e NCE. Para NCE o valor de IC₅₀ para NIH-3T3 foi de 406,3 µg/mL, enquanto para RAW 264.7 foi de 45,6 µg/mL, cerca de 10x menor. Para NCB os valores de IC₅₀ foram semelhantes, para NIH-3T3 foi de 992,4 μg/mL e de 1176 μg/mL para RAW 264.7. Os valores de IC50 evidenciam que as células NIH-3T3 demonstraram maior resistência ao tratamento com as nanopartículas, quando comparadas às células RAW 264.7. Os comportamentos observados podem estar relacionados às características biológicas de cada linhagem. Os macrófagos, por serem células fagocitárias do sistema imunológico, podem internalizar uma maior quantidade de nanopartículas que impactam na toxicidade de forma mais intensa. Essa conjectura pode ser apoiada pelo trabalho de Jahan et al. (2024) que demonstrou, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), que NpCeO₂ revestidas com fibras de poli-ε-caprolactonas são internalizadas pelas células RAW 264.7 formando vacúolos que ocupam proporção significativa do volume citoplasmático, levando a processos de autofagia. As análises morfológicas de RAW 264.7 tratadas com NCB e NCE corroboram com essa afirmação, principalmente nas concentrações mais elevadas.

Embora os fibroblastos NIH-3T3 também apresentem grande capacidade de internalizar NpCeO₂ devido a sua propriedade proliferativa robusta, observamos que o efeito da toxicidade de NCB a longo prazo é desprezível. Conforme observado pelo ensaio de viabilidade em tempo real, a linhagem NIH-3T3 exibiu valores de luminescência maiores do que RAW 264.7. Em apenas 24h, após ambas as linhagens serem plaqueadas com a

mesma densidade (1,5 x 10³ células/poço), os valores de luminescência para NIH –3T3 foram cerca de 174% maior do que RAW 264.7 reforçando que a taxa de proliferação dos fibroblastos é mais alta do que a dos macrófagos. Portanto, ainda que as NpCeO₂ tenham gerado morte para parte das células RAW 264.7 e NIH-3T3, possivelmente os fibroblastos remanescentes se recuperaram mais rapidamente.

Em consonância com os resultados de viabilidade observados neste trabalho, Lopez-Pascual et al. (2019) mostraram que NpCeO₂ causaram uma redução significativa na atividade metabólica dos macrófagos RAW 264.7, principalmente na concentração de 50 μg/mL. No entanto, esse efeito não foi significativo nas linhagens 3T3-L1 e C2C12. Kim & Chung (2016) demonstraram que NpCeO₂, em concentrações de até 1000 μg/mL, não causaram citotoxicidade significativa para NIH-3T3, corroborando com a observação de que fibroblastos NIH-3T3 apresentam alta tolerância à exposição a NpCeO₂.

Além da suscetibilidade intrínseca de cada linhagem às NpCeO₂, a literatura destaca a influência das concentrações e propriedades físico-químicas na biocompatibilidade (Mortazavi Milani et al., 2017; Singh et al., 2020). No presente estudo, embora as concentrações de NCB e NCE não fossem idênticas, observou-se que, mesmo em concentrações semelhantes, as células apresentaram respostas distintas. Por exemplo, a exposição a 8 μg/mL de NCE resultou em uma redução de aproximadamente 40% na viabilidade celular de RAW 264.7, enquanto a exposição a 10,2 μg/mL de NCB não provocou redução significativa na viabilidade. Esses resultados sugerem que fatores além da concentração desempenham um papel predominante na citotoxicidade. Considerando que NCB e NCE possuem funcionalização idêntica, bem como PDI e PZ semelhantes, levantamos a hipótese de que o formato e o DH são os principais determinantes do efeito citotóxico observado.

O mecanismo de internalização celular pode ser influenciado pelo formato e pelo tamanho. Por exemplo, nanopartículas esféricas são mais facilmente internalizadas pelas células devido à sua simetria, o que pode levar a uma maior concentração intracelular e maior citotoxicidade. Já nanopartículas assimétricas, como de bastão e cilíndricas, podem ser internalizadas de maneira mais controlada, o que reduz os danos intracelulares (Panzarini et al., 2018). Além disso, o maior DH de NCE pode favorecer a formação de agregados e causar interações físicas agressivas com a membrana celular, como já mostrado em estudos anteriores (Afrooz et al., 2013; Lavagna et al., 2020).

Após a definição das concentrações experimentais, avaliou-se o potencial antioxidante de NCB. As NpCeO₂ têm se destacado na área biomédica por suas propriedades redox, atribuídas à presença de sítios de vacância de oxigênio e à sua atividade mimética de diversas enzimas antioxidantes (Lord et al., 2021). Estudos anteriores demonstraram atividade antioxidante significativa das NpCeO₂ em células RAW 264.7, utilizando concentrações de até 100 μg/mL. Yin et al. (2024) relataram uma redução dos níveis ERO a valores comparáveis aos observados em células não estressadas. De forma similar, Lopez-Pascual et al. (2019) também evidenciaram uma redução significativa nos níveis de ERO após o tratamento. Em nosso estudo, a NCB mesmo em concentrações menores que 100 μg/mL apresentou atividade antioxidante significativa, corroborando os achados anteriores e reforçando o potencial dessas nanopartículas na modulação do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo prolongado pode contribuir com o desenvolvimento e progressão de diversas doenças inflamatórias. Nesse contexto, estratégias terapêuticas baseadas em antioxidantes têm emergido como alternativas promissoras para o tratamento dessas condições, devido à sua capacidade de modular os processos inflamatórios e reduzir o dano oxidativo (Corsi et al., 2023).

Estudos prévios demonstraram o potencial anti-inflamatório das NpCeO₂. Machhi et al. (2022) observaram uma redução expressiva nos níveis de mediadores inflamatórios, como NO, TNF-α e IL-6 em células de microglia ativadas por LPS e tratadas com 100 ng/mL de NpCeO₂. Selvaraj et al. (2015) relataram resultados semelhantes em macrófagos RAW 264.7, onde concentrações de 1 μg/mL de NpCeO₂ também reduziram significativamente os níveis de NO, TNF-α e IL-6. Além disso, Kurtuldu et al. (2021) confirmaram que concentrações mais elevadas (50 μg/mL) de NpCeO₂ também são eficazes na diminuição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS, destacando o potencial dose-dependente dessas nanopartículas.

Os dados obtidos no presente estudo corroboram e ampliam os achados prévios, uma vez que as células tratadas com NCB mantiveram os níveis de óxido nítrico (NO) próximos ao estado basal. Além disso, observou-se uma redução nos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-10, com decréscimos de 26%, 48% e 18%, respectivamente. Esses resultados indicam que as NCB desempenham um papel modulador no processo inflamatório, atuando na atenuação dos mediadores pró-inflamatórios, possivelmente em

função da redução do estresse oxidativo, como evidenciado pelo ensaio de atividade antioxidante. Tais efeitos sugerem que as NCB podem contribuir para o controle da resposta inflamatória, promovendo um ambiente favorável à regeneração tecidual (Ribeiro et al., 2020).

Nesse contexto, os resultados obtidos neste estudo indicam que a NCB se apresenta como uma ferramenta promissora para promover também a cicatrização de feridas, uma vez que atuam de maneira eficaz sobre alguns dos principais desafios associados a esse processo, como infecção e estresse (Whittam et al., 2016).

Em apoio a esses achados, Duan et al. (2024) observaram que as NpCeO₂ aceleraram a migração de células da polpa dentária de forma significativa, na concentração de 1 mg/mL, o que está em linha com os achados do presente estudo, onde concentração 12x menor de NCB apresentou resultados equivalentes. Xie et al. (2022) também relataram um aumento significativo na migração de células endoteliais linfáticas após tratamento com NpCeO₂ (1% em p/v) após 12 e 24h, com um aumento superior ao observado no grupo tratado com o fator de crescimento endotelial vascular. Por fim, Jin et al. (2023) avaliaram os efeitos das NpCeO₂ a 3% (p/v) em fibroblastos gengivais humanos, observando um aumento de 50% na migração celular em comparação com o controle após 4 a 8h.

Como mencionado anteriormente, a literatura aponta que as NpCeO₂ têm a capacidade de reduzir os níveis de ERO, induzindo uma resposta fisiológica que favorece a proliferação e a migração celular (Duan et al., 2024; Jin et al., 2023; Xie et al., 2022. Esse efeito foi corroborado pelos resultados deste estudo, que demonstraram que as NCB promoveram uma taxa de proliferação e migração ligeiramente superior (18%) ao controle após 24h e 48h, destacando o potencial das NCB como agentes promissores na promoção dos processos regenerativos e de cicatrização de feridas.

Os resultados deste estudo destacam que NCB e NCE como promissoras candidatas para aplicações biomédicas, não apenas devido às suas propriedades físico-químicas vantajosas, estabilidade coloidal e efeitos biológicos benéficos, mas também pelo caráter inovador dessas nanopartículas. Até o momento, não foram encontrados estudos que utilizem NpCeO₂ revestidas com citrato de sódio, sintetizadas pelo método de hidrólise alcalina, nem que investiguem as propriedades biológicas associadas a diferentes formatos.

Com base nos resultados obtidos, NCB e NCE demonstraram potencial para diversas aplicações na área da saúde. A atividade antimicrobiana de NCE contra *S. aureus* sugere seu uso em revestimentos antimicrobianos para dispositivos médicos, como cateteres e implantes, reduzindo infecções hospitalares. O efeito antioxidante e anti-inflamatório de NCB indica aplicações no tratamento de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e dermatites crônicas, além de doenças associadas ao estresse oxidativo, como Alzheimer e aterosclerose. O potencial cicatrizante e a capacidade de estimular a proliferação celular de NCB destacam sua viabilidade para curativos bioativos e terapias para feridas crônicas e queimaduras. Dessa forma, essas características tornam a NCB e a NCE promissoras para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e biomateriais inovadores.

No entanto, questões como a influência do formato e tamanho no processo de internalização celular, bem como os impactos a longo prazo dessas de NCB e NCE no ambiente e no organismo, ainda necessitam de maior investigação. Portanto, estudos futuros devem direcionar-se para a avaliação *in vivo* do desempenho das nanopartículas, explorar diferentes modelos de doenças e investigar os efeitos crônicos da exposição, visando a otimização de suas propriedades e a garantia de sua segurança para aplicação clínica.



7. CONCLUSÕES

Considerando os principais resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que:

- NCB e NCE apresentaram suas características físico-químicas estáveis por um período de até 70 dias a 4°C.
- Os valores do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (PDI) e do potencial zeta (PZ) indicam que NCB e NCE são apropriadas para ensaios biológicos.
- Não foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de NCB e NCE frente às cepas investigadas. No entanto, S. aureus apresentou maior sensibilidade a ambas, com NCE exibindo um efeito mais pronunciado do que NCB.
- Os valores da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) e as características morfológicas das células indicam que a NCB foi menos citotóxica para as células de macrófagos (RAW 264.7) e fibroblastos (NIH-3T3) em comparação à NCE.
- NCB apresentou um efeito protetor contra o estresse oxidativo, com uma redução significativa dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO).
- NCB possui propriedades anti-inflamatórias evidenciadas pela diminuição dos níveis de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina – 6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10).
- NCB exibiu potencial cicatrizante, acentuando a migração e proliferação de fibroblastos (NIH-3T3) de forma ligeiramente superior ao controle.

Esses achados apontam para o grande potencial de NCB e NCE em aplicações biomédicas, destacando as propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes da NCB. Contudo, vale ressaltar que os achados são baseados exclusivamente em modelos *in vitro*, o que limita as conclusões sobre a segurança e eficácia desses materiais em organismos vivos. Sendo assim, são necessários estudos adicionais *in vivo* para confirmar seu potencial terapêutico e clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afrooz, A. R. M. N., Sivalapalan, S. T., Murphy, C. J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., & Saleh, N. B. (2013). Spheres vs. rods: The shape of gold nanoparticles influences aggregation and deposition behavior. *Chemosphere*, *91*(1), 93–98. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.031

Ahmad, T., Iqbal, J., Bustam, M. A., Babar, M., Tahir, M. B., Sagir, M., Irfan, M., Anwaar Asghar, H. M., Hassan, A., Riaz, A., Chuah, L. F., Bokhari, A., Mubashir, M., & Show, P. L. (2023). Performance evaluation of phosphonium based deep eutectic solvents coated cerium oxide nanoparticles for CO2 capture. *Environmental Research*, *222*, 115314. https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.115314

Akhtar, M. J., Ahamed, M., & Alhadlaq, H. (2021). Anti-inflammatory ceo2 nanoparticles prevented cytotoxicity due to exogenous nitric oxide donors via induction rather than inhibition of superoxide/nitric oxide in huve cells. *Molecules*, *26*(17). https://doi.org/10.3390/molecules26175416

Alpaslan, E., Geilich, B. M., Yazici, H., & Webster, T. J. (2017). PH-Controlled Cerium Oxide Nanoparticle Inhibition of Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Growth. *Scientific Reports*, 7. https://doi.org/10.1038/srep45859

Augustine, R., Zahid, A. A., Hasan, A., Dalvi, Y. B., & Jacob, J. (2021). Cerium Oxide Nanoparticle-Loaded Gelatin Methacryloyl Hydrogel Wound-Healing Patch with Free Radical Scavenging Activity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(1), 279–290. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01138

Balachandar, V., Rajagopalan, K., Jayaramayya, K., Jeevanandam, M., & Iyer, M. (2021). Mitochondrial dysfunction: A hidden trigger of autism? In *Genes and Diseases* (Vol. 8, Issue 5, pp. 629–639). Chongqing University. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.07.002

Balaram, V. (2019). Rare earth elements: A review of applications, occurrence, exploration, analysis, recycling, and environmental impact. *Geoscience Frontiers*, *10*(4), 1285–1303. https://doi.org/10.1016/j.gsf.2018.12.005

Brandão da Silva Assis, M., de Moraes, G. N., & de Souza, K. R. (2024). Cerium oxide nanoparticles: Chemical properties, biological effects and potential therapeutic opportunities (Review). In *Biomedical Reports* (Vol. 20, Issue 3). Spandidos Publications. https://doi.org/10.3892/br.2024.1736

Cândido, M. A., dos Santos Jesus, V. P., Vieira, P. F. A., Campos, A., & Raniero, L. (2024). Chemical and cellular characterization of SPIONs stabilized with sodium citrate. *Research on Biomedical Engineering*, *41*(1), 1. https://doi.org/10.1007/s42600-024-00384-1

Carvajal, S., Perramón, M., Oró, D., Casals, E., Fernández-Varo, G., Casals, G., Parra, M., González de la Presa, B., Ribera, J., Pastor, Ó., Morales-Ruíz, M., Puntes, V., & Jiménez, W. (2019). Cerium oxide nanoparticles display antilipogenic effect in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-49262-2

- Chatzimentor, I., Tsamesidis, I., Ioannou, M. E., Pouroutzidou, G. K., Beketova, A., Giourieva, V., Papi, R., & Kontonasaki, E. (2023). Study of Biological Behavior and Antimicrobial Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Pharmaceutics*, *15*(10). https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15102509
- Chen, S., Wang, Y., Bao, S., Yao, L., Fu, X., Yu, Y., Lyu, H., Pang, H., Guo, S., Zhang, H., Zhou, P., & Zhou, Y. (2024). Cerium oxide nanoparticles in wound care: a review of mechanisms and therapeutic applications. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 12). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1404651
- Corsi, F., Deidda Tarquini, G., Urbani, M., Bejarano, I., Traversa, E., & Ghibelli, L. (2023). The Impressive Anti-Inflammatory Activity of Cerium Oxide Nanoparticles: More than Redox? In *Nanomaterials* (Vol. 13, Issue 20). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/nano13202803
- De Sá, E. M. F., Bolzan, A., & Machado, R. A. F. (n.d.). *EFEITO DA RELAÇÃO MOLAR REDUTOR/PRECURSOR NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA USANDO CITRATO DE SÓDIO E DODECIL SULFATO DE SÓDIO.*
- Duan, Y., Zheng, K., Hu, W., Chen, J. J., Lu, X., Wang, M., Yang, Y., Guo, J., Lu, Y., & Ma, Q. (2024). Anti-inflammatory cerium-containing nano-scaled mesoporous bioactive glass for promoting regenerative capability of dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, *57*(6), 727–744. https://doi.org/10.1111/iej.14055
- Ernst, L. M., & Puntes, V. (2022). How Does Immunomodulatory Nanoceria Work? ROS and Immunometabolism. *Frontiers in Immunology*, 13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.750175
- Estevez, A. Y., Ganesana, M., Trentini, J. F., Olson, J. E., Li, G., Boateng, Y. O., Lipps, J. M., Yablonski, S. E. R., Donnelly, W. T., Leiter, J. C., & Erlichman, J. S. (2019). Antioxidant enzyme-mimetic activity and neuroprotective effects of cerium oxide nanoparticles stabilized with various ratios of citric acid and EDTA. *Biomolecules*, *9*(10). https://doi.org/10.3390/biom9100562
- Farias, I. A. P., Dos Santos, C. C. L., & Sampaio, F. C. (2018). Antimicrobial activity of cerium oxide nanoparticles on opportunistic microorganisms: A systematic review. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2018/1923606
- Fernandes, R. de P. P., Trindade, M. A., & de Melo, M. P. (2018). Natural Antioxidants and Food Applications: Healthy Perspectives. *Alternative and Replacement Foods*, *17*, 31–64. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811446-9.00002-2
- Fu, X., Li, P., Chen, X., Ma, Y., Wang, R., Ji, W., Gu, J., Sheng, B., Wang, Y., & Zhang, Z. (2024). Ceria nanoparticles: biomedical applications and toxicity. In *Journal of Zhejiang University: Science B* (Vol. 25, Issue 5, pp. 361–388). Zhejiang University. https://doi.org/10.1631/jzus.B2300854

Gajbhiye, S. S., Salve, M. V., Gaikwad, M. D., Rasage, A. R., Khater, M. S., Ghadage, V. H., & Chaure, N. B. (2024). Influence of Synthesis Conditions on the Physical Characteristics and Antibacterial activities of Cerium Oxide Nanoparticles in Biomedical Applications. *Engineered Science*, *32*. https://doi.org/10.30919/es1254

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). https://doi.org/10.3390/ijms222312827

Ghezzi, P. (2020). Environmental risk factors and their footprints in vivo – A proposal for the classification of oxidative stress biomarkers. In *Redox Biology* (Vol. 34). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101442

Hanzha, V. V., Rozumna, N. M., Kravenska, Y. V., Spivak, M. Y., & Lukyanetz, E. A. (2023). The effect of cerium dioxide nanoparticles on the viability of hippocampal neurons in Alzheimer's disease modeling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17. https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131168

Hashem, R. M., Rashd, L. A., Hashem, K. S., & Soliman, H. M. (2015). Cerium oxide nanoparticles alleviate oxidative stress and decreases Nrf-2/HO-1 in D-GALN/LPS induced hepatotoxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 73, 80–86. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.05.006

Hijaz, M., Das, S., Mert, I., Gupta, A., Al-Wahab, Z., Tebbe, C., Dar, S., Chhina, J., Giri, S., Munkarah, A., Seal, S., & Rattan, R. (2016). Folic acid tagged nanoceria as a novel therapeutic agent in ovarian cancer. *BMC Cancer*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12885-016-2206-4

Jahan, U. M., Blevins, B., Minko, S., & Reukov, V. V. (2024). Advancing biomedical applications: antioxidant and biocompatible cerium oxide nanoparticle-integrated poly-ε-caprolactone fibers. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 11(1). https://doi.org/10.1088/2057-1976/ad927f

Javid, H., Hashemy, S. I., Heidari, M. F., Esparham, A., & Gorgani-Firuzjaee, S. (2022). The Anticancer Role of Cerium Oxide Nanoparticles by Inducing Antioxidant Activity in Esophageal Cancer and Cancer Stem-Like ESCC Spheres. *BioMed Research International*, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/3268197

Jing, H., Mezgebe, B., Aly Hassan, A., Sahle-Demessie, E., Sorial, G. A., & Bennett-Stamper, C. (2014). Experimental and modeling studies of sorption of ceria nanoparticle on microbial biofilms. *Bioresource Technology*, *161*, 109–117. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.03.015

Khan, M., Sohail, Raja, N. I., Asad, M. J., & Mashwani, Z. ur R. (2023). Antioxidant and hypoglycemic potential of phytogenic cerium oxide nanoparticles. *Scientific Reports*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-023-31498-8

Kim, S. J., & Chung, B. H. (2016). Antioxidant activity of levan coated cerium oxide nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *150*, 400–407. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.021

Kowsuki, K., Nirmala, R., Ra, Y. H., & Navamathavan, R. (2023). Recent advances in cerium oxide-based nanocomposites in synthesis, characterization, and energy storage comprehensive Results applications: Α review. in Chemistry, 5, 100877. https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2023.100877

Kuang, Y., He, X., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, H., Ma, Y., Wu, Z., & Dournal, Comparison study on the antibacterial activity of nano- or bulk-cerium oxide. Journal of nanoscience and nanotechnology, 11(5), 4103–4108. https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3858

Kurtuldu, F., Kaňková, H., Beltrán, A. M., Liverani, L., Galusek, D., & Boccaccini, A. R. (2021). Anti-inflammatory and antibacterial activities of cerium-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for drug-free biomedical applications. *Materials Today Bio*, *12*, 100150. https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2021.100150

Lavagna, E., Barnoud, J., Rossi, G., & Monticelli, L. (2020). Size-dependent aggregation of hydrophobic nanoparticles in lipid membranes. *Nanoscale*, *12*(17), 9452–9461. https://doi.org/10.1039/d0nr00868k

Laxminarayan, R., Van Boeckel, T., Frost, I., Kariuki, S., Khan, E. A., Limmathurotsakul, D., Larsson, D. G. J., Levy-Hara, G., Mendelson, M., Outterson, K., Peacock, S. J., & Zhu, Y. G. (2020). The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(4), e51–e60. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30003-7

Lopez-Pascual, A., Urrutia-Sarratea, A., Lorente-Cebrián, S., Martinez, J. A., & González-Muniesa, P. (2019). Cerium oxide nanoparticles regulate insulin sensitivity and oxidative markers in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. https://doi.org/10.1155/2019/2695289

Lord, M. S., Berret, J. F., Singh, S., Vinu, A., & Karakoti, A. S. (2021). Redox Active Cerium Oxide Nanoparticles: Current Status and Burning Issues. In *Small* (Vol. 17, Issue 51). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/smll.202102342

Luo, J., Liu, W., Xie, Q., He, J., & Jiang, L. (2023). Synthesis and characterisation of a novel poly(2-hydroxyethylmethacrylate)-chitosan hydrogels loaded cerium oxide nanocomposites dressing on cutaneous wound healing on nursing care of chronic wound. *IET Nanobiotechnology*, *17*(4), 312–325. https://doi.org/10.1049/nbt2.12118

Ma, H., Liu, Z., Koshy, P., Sorrell, C. C., & Hart, J. N. (2022). Density Functional Theory Investigation of the Biocatalytic Mechanisms of pH-Driven Biomimetic Behavior in CeO2. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *14*(9), 11937–11949. https://doi.org/10.1021/acsami.1c24686

MacHhi, J., Yeapuri, P., Markovic, M., Patel, M., Yan, W., Lu, Y., Cohen, J. D., Hasan, M., Abdelmoaty, M. M., Zhou, Y., Xiong, H., Wang, X., Mosley, R. L., Gendelman, H. E., & Kevadiya, B. D. (2022). Europium-Doped Cerium Oxide Nanoparticles for Microglial Amyloid Beta Clearance and Homeostasis. *ACS Chemical Neuroscience*, *13*(8), 1232–1244. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00847

Melchionna, M., Trovarelli, A., & Fornasiero, P. (2020). Synthesis and properties of cerium oxide-based materials. *Cerium Oxide (CeO2): Synthesis, Properties and Applications*, 13–43. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815661-2.00002-5

Mishra, S. R., & Ahmaruzzaman, Md. (2021). Cerium oxide and its nanocomposites: Structure, synthesis, and wastewater treatment applications. *Materials Today Communications*, *28*, 102562. https://doi.org/10.1016/J.MTCOMM.2021.102562

Moreira, P., Sousa, F. J., Matos, P., Brites, G. S., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Figueirinha, A., Salgueiro, L., Batista, M. T., Branco, P. C., Cruz, M. T., & Pereira, C. F. (2022). Chemical Composition and Effect against Skin Alterations of Bioactive Extracts Obtained by the Hydrodistillation of Eucalyptus globulus Leaves. *Pharmaceutics*, *14*(3). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030561

Mortazavi Milani, Z., Charbgoo, F., & Darroudi, M. (2017). Impact of physicochemical properties of cerium oxide nanoparticles on their toxicity effects. *Ceramics International*, *43*(17), 14572–14581. https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2017.08.177

Muthuvel, A., Jothibas, M., Mohana, V., & Manoharan, C. (2020). Green synthesis of cerium oxide nanoparticles using Calotropis procera flower extract and their photocatalytic degradation and antibacterial activity. *Inorganic Chemistry Communications*, *119*, 108086. https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2020.108086

Nyoka, M., Choonara, Y. E., Kumar, P., Kondiah, P. P. D., & Pillay, V. (2020). Synthesis of cerium oxide nanoparticles using various methods: Implications for biomedical applications. In *Nanomaterials* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nano10020242

Panzarini, E., Mariano, S., Carata, E., Mura, F., Rossi, M., & Dini, L. (2018). Intracellular transport of silver and gold nanoparticles and biological responses: An update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19051305

Pinna, A., Malfatti, L., Galleri, G., Manetti, R., Cossu, S., Rocchitta, G., Migheli, R., Serra, P. A., & Innocenzi, P. (n.d.). *Ceria nanoparticles for the treatment of Parkinson-like diseases induced by chronic manganese intoxication*. www.rsc.org/advances

Raja, I. S., & Fathima, N. N. (2018). Gelatin-cerium oxide nanocomposite for enhanced excisional wound healing. *ACS Applied Bio Materials*, *1*(2), 487–495. https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00208

Ribeiro, F. M., de Oliveira, M. M., Singh, S., Sakthivel, T. S., Neal, C. J., Seal, S., Ueda-Nakamura, T., Lautenschlager, S. de O. S., & Nakamura, C. V. (2020). Ceria Nanoparticles

Decrease UVA-Induced Fibroblast Death Through Cell Redox Regulation Leading to Cell Survival, Migration and Proliferation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.577557

Rubio, L., Annangi, B., Vila, L., Hernández, A., & Marcos, R. (2016). Antioxidant and antigenotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Archives of Toxicology*, *90*(2), 269–278. https://doi.org/10.1007/s00204-015-1468-y

Schug, A. R., Bartel, A., Scholtzek, A. D., Meurer, M., Brombach, J., Hensel, V., Fanning, S., Schwarz, S., & Feßler, A. T. (2020). Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Veterinary Microbiology*, *248*. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108791

Scirè, S., & Palmisano, L. (2020). Cerium and cerium oxide: A brief introduction. *Cerium Oxide (CeO2): Synthesis, Properties and Applications*, 1–12. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815661-2.00001-3

Sehar, S., Naz, I., Rehman, A., Sun, W., Alhewairini, S. S., Zahid, M. N., & Younis, A. (2021). Shape-controlled synthesis of cerium oxide nanoparticles for efficient dye photodegradation and antibacterial activities. *Applied Organometallic Chemistry*, 35(1). https://doi.org/10.1002/aoc.6069

Selvaraj, V., Nepal, N., Rogers, S., Manne, N. D. P. K., Arvapalli, R., Rice, K. M., Asano, S., Fankenhanel, E., Ma, J. Y., Shokuhfar, T., Maheshwari, M., & Blough, E. R. (2015). Cerium oxide nanoparticles inhibit lipopolysaccharide induced MAP kinase/NF-kB mediated severe sepsis. *Data in Brief*, *4*, 105–115. https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.04.023

Shao, X. R., Wei, X. Q., Song, X., Hao, L. Y., Cai, X. X., Zhang, Z. R., Peng, Q., & Lin, Y. F. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, *48*(4), 465–474. https://doi.org/10.1111/cpr.12192

Silina, E. V., Ivanova, O. S., Manturova, N. E., Medvedeva, O. A., Shevchenko, A. V., Vorsina, E. S., Achar, R. R., Parfenov, V. A., & Stupin, V. A. (2024). Antimicrobial Activity of Citrate-Coated Cerium Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*, *14*(4). https://doi.org/10.3390/nano14040354

Silina, E. V., Stupin, V. A., Manturova, N. E., Ivanova, O. S., Popov, A. L., Mysina, E. A., Artyushkova, E. B., Kryukov, A. A., Dodonova, S. A., Kruglova, M. P., Tinkov, A. A., Skalny, A. V., & Ivanov, V. K. (2023). Influence of the Synthesis Scheme of Nanocrystalline Cerium Oxide and Its Concentration on the Biological Activity of Cells Providing Wound Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(19). https://doi.org/10.3390/ijms241914501

Singh, K. R. B., Nayak, V., Sarkar, T., & Singh, R. P. (2020). Cerium oxide nanoparticles: Properties, biosynthesis and biomedical application. In *RSC Advances* (Vol. 10, Issue 45, pp. 27194–27214). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/d0ra04736h

- Singh, S., Young, A., & Mcnaught, C.-E. (n.d.). The physiology of wound healing.
- SOUZA, Jacqueline Stella Barbosa de. Atividade Antimicrobiana de Nanopartículas de CeO₂ in vitro frente as bactérias Escherichia coli e Staphylococcus aureus. 2016. 73 f. TCC (Graduação) Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.
- Tsuji, B. T., Landersdorfer, C. B., Lenhard, J. R., Cheah, S. E., Thamlikitkul, V., Rao, G. G., Holden, P. N., Forrest, A., Bulitta, J. B., Nation, R. L., & Li, J. (2016). Paradoxical effect of polymyxin B: High drug exposure amplifies resistance in Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(7), 3913–3920. https://doi.org/10.1128/AAC.02831-15
- Wang, J., Liu, Y., Guo, Y., Liu, C., Yang, Y., Fan, X., Yang, H., Liu, Y., & Ma, T. (2024). Function and inhibition of P38 MAP kinase signaling: Targeting multiple inflammation diseases. *Biochemical Pharmacology*, 220, 115973. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115973
- Wang, K., Mitra, R. N., Zheng, M., & Han, Z. (2018). Nanoceria-loaded injectable hydrogels for potential age-related macular degeneration treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *106*(11), 2795–2804. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36450
- Whittam, A. J., Maan, Z. N., Duscher, D., Wong, V. W., Barrera, J. A., Januszyk, M., & Gurtner, G. C. (2016). Challenges and Opportunities in Drug Delivery for Wound Healing. *Advances in Wound Care*, *5*(2), 79–88. https://doi.org/10.1089/wound.2014.0600
- Xie, H., Sha, S., Lu, L., Wu, G., Jiang, H., Boccaccini, A. R., Zheng, K., & Xu, R. (2022). Cerium-Containing Bioactive Glasses Promote In Vitro Lymphangiogenesis. *Pharmaceutics*, *14*(2). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020225
- Yadav, N., & Singh, S. (n.d.). Supporting Information Polyoxometalate-mediated vacancy engineered cerium oxide nanoparticles exhibiting controlled biological enzyme mimicking activities.
- Yadav, N., & Singh, S. (2021). Polyoxometalate-Mediated Vacancy-Engineered Cerium Oxide Nanoparticles Exhibiting Controlled Biological Enzyme-Mimicking Activities. *Inorganic Chemistry*, *60*(10), 7475–7489. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00766
- Yi, L., Yu, L., Chen, S., Huang, D., Yang, C., Deng, H., Hu, Y., Wang, H., Wen, Z., Wang, Y., & Tu, Y. (2024). The regulatory mechanisms of cerium oxide nanoparticles in oxidative stress and emerging applications in refractory wound care. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1439960
- Yin, M., Lei, D., Liu, Y., Qin, T., Gao, H., Lv, W., Liu, Q., Qin, L., Jin, W., Chen, Y., Liang, H., Wang, B., Gao, M., Zhang, J., & Lu, J. (2024). NIR triggered polydopamine coated cerium dioxide nanozyme for ameliorating acute lung injury via enhanced ROS scavenging. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1). https://doi.org/10.1186/s12951-024-02570-w

Zamani, K., Allah-Bakhshi, N., Akhavan, F., Yousefi, M., Golmoradi, R., Ramezani, M., Bach, H., Razavi, S., Irajian, G. R., Gerami, M., Pakdin-Parizi, A., Tafrihi, M., & Ramezani, F. (2021). Antibacterial effect of cerium oxide nanoparticle against Pseudomonas aeruginosa. *BMC Biotechnology*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s12896-021-00727-1

Zhang, M., Zhang, C., Zhai, X., Luo, F., Du, Y., & Yan, C. (2019). Antibacterial mechanism and activity of cerium oxide nanoparticles. In *Science China Materials* (Vol. 62, Issue 11, pp. 1727–1739). Science China Press. https://doi.org/10.1007/s40843-019-9471-7