

 **Universidade de Brasília**
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

**Síntese e caracterização de nanopartículas de PEG adsorvidas com glicina
(Gly@PEG/NPs) para aplicação biotecnológica:
um estudo *in vitro*.**

Paulo Celso Leventi Guimarães

Prof. Dr. Sebastião William Da Silva
Orientador

Brasília – Distrito Federal
Junho 2018



Universidade de Brasília
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

**Síntese e caracterização de nanopartículas de PEG adsorvidas com glicina
(Gly@PEG/NPs) para aplicação biotecnológica:
um estudo *in vitro*.**

Paulo Celso Leventi Guimarães

Prof. Dr. Sebastião William Da Silva
Orientador

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília – Distrito Federal
Junho 2018

Colaboradores

Laboratório de Imunomodulação e saúde materno infantil ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças-MT.

Profa. Dr^a. Adenilda Cristina Honório França

Laboratório de Cronobiologia ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças-MT.

Prof. Dr. Eduardo Luzia França

Instituições Parceiras:

Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Universidade de Brasília – UnB

Suporte Financeiro

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMAT-Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso

Descobertas

“Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter persistência e vontade, do que qualquer outro talento.” *Isaac Newton*. Foi por insistir, acreditar e receber apoio da família e colaboradores, que cheguei até aqui.

Agradecimentos

Aos meus pais, **Ademir e Lilian**, aos meus irmãos **Ademir Jr. e Rodrigo** por toda demonstração de carinho e afeto.

A minha esposa **Tatiany**, pelo apoio, pela paciência e por ser essa pessoa importante na minha vida;

Aos meus filhos **João Paulo e Luiz Antônio**, por se tornarem homens capazes de enfrentar desafios na vida e me horarem muito.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Sebastião**, pela disponibilidade, pelo conhecimento, pela competência, pela capacidade, pela empatia, pela compreensão e pelas broncas! Bem como por ser um exemplo de ser humano, profissional e pesquisador.

Ao meu co-orientador, Prof. **Dr. Eduardo Luzia França** por toda a parceria, compreensão e estímulo.

A **Prof.ª Dr.ª Adenilda Cristina Honorio-França**, por toda versatilidade e bons exemplos.

Ao professor **Ricardo Bentes de Azevedo**, por viabilizar tudo que foi preciso.

Ao professor **Paulo Eduardo Narcizo de Souza**, pela parceria e disponibilidade.

Ao professor **Marcelo Henrique de Sousa**, pela disposição e orientações.

A professora **Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**, por aceitar participar do trabalho.

A **Jaqueline Rodrigues da Silva**, pela paciência, trabalho e parceria

A turma do laboratório CNANO: Fábio (japonês), Queila, Camila, Antônia, Luís, Grazielle, Ísis, Lucélia, Deizilene, Deize, Manuela, Karen Py, Maria, Thamara, Diogo, Hermano. (Dannylaura, Patrícia, Claudia, Alessandra UFMT)

Biografia

Paulo Celso Leventi Guimarães, filho de Ademir Soares Guimarães e Lilian Noemi Lev Guimarães, nasceu em 17 de maio de 1971, na cidade de Cuiabá-MT.

Em março de 2001, iniciou o curso de Tecnologia em alimentos, com ênfase em processamento de carnes no Centro Federal de Educação Tecnológica de Cuiabá/Campus São Vicente CEFET-SVC, concluiu em 2004, neste mesmo ano foi aprovado em concurso público no CEPROTEC – Centro de Educação profissional do Estado de Mato Grosso, atualmente SECITEC – Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso, unidade Barra do Garças. Foi selecionado em março de 2011 para o Curso de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, em nível de Mestrado, na área de Bioensaios e processos fisiopatológicos na Universidade Federal de Mato Grosso/Campus Universitário do Araguaia, em Barra do Garças-MT, concluindo o curso em dezembro de 2012. Neste mesmo ano foi aprovado em concurso público no IFMT – Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso, campus Barra do Garças. Em julho de 2013 foi selecionado no programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, em nível de Doutorado, na área de materiais nanoestruturados em aplicações biotecnológicas, como sistemas de entrega de drogas, da Universidade de Brasília/Campus Darcy Ribeiro, em Brasília/DF, submetendo-se à defesa de tese para conclusão do curso em junho de 2018.

Dedico....

Principalmente a minha Mãe:

Por nunca ter desistido de mim. Quero que a senhora, mãe querida, saiba que hoje graças ao esforço e dedicação vindos da grandeza de sua existência que: O filho que a senhora ensinou a ler e escrever em casa, hoje tonar-se-á Doutor.

Ao meu Pai:

Pela parceria, por apontar o sentido e a direção.

A minha Esposa:

Tatiany, pela parceria, parcimônia e paciência.

Aos meus filhos:

João Paulo e Luiz Antônio, pelo crescimento, amadurecimento, responsabilidade e capacidade, pela coragem e por enfrentar os desafios do caminho.

Aos Meus Irmãos:

Ademir Júnior e Rodrigo, pela confiança e apoio.

Ao Sebastião William da Silva e Eduardo Luzia França:

Por serem mais que um orientador, são grandes parceiros e amigos, sou grato pelo estímulo, positivismo, pelo brilho, serenidade, firmeza, eficiência e tempo dedicado a mim.

E a todos que colaboraram de algum modo.

Resumo

Este estudo relata o sucesso na preparação, caracterização e teste biológico *in vitro* de suspensão coloidal biocompatível formada a partir do carregamento de glicina (Gly) em nanopartículas de polietilenoglicol (PEG) suspensas em PBS (Gly@PEG/NPs). A interação entre a molécula de Gly e as nanopartículas de PEG foi investigada usando espectroscopia Raman normal e espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS), empregando coloide de prata com substrato ativo. Além do mais, microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (TEM), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram empregados para caracterizar as amostras. As atividades biológicas do complexo Gly@PEG/NPs em macrófagos do colostro humano, estimulados pela bactéria *Escherichia coli* (EPEC), foram avaliados quanto a viabilidade, fagocitose, atividade microbida e produção de citocinas. Análises morfológicas revelaram que as nanopartículas do complexo Gly@PEG/NPs apresentam formato não esférica com diâmetro médio (índice de polidispersão) de 54,3 nm (0,16). Imagens de TEM de alta resolução demonstraram a coexistência de fases cristalinas e amorfas na estrutura do complexo Gly@PEG/NPs. Os espectros de FTIR, Raman normal e SERS sugerem fortemente que os grupos amino protonados (NH_3^+) das moléculas Gly se ligam aos átomos de oxigênio da molécula de PEG por meio de ligações de hidrogênio, deixando o grupo carboxilato (COO^-) voltados para a massa aquosa do meio. Ensaios, usando método MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio), em células RAW 264.7 e em macrófagos de colostro humano tratados com o complexo Gly@PEG/NPs revelaram que a viabilidade celular desses sistemas é superior a 85%. Bioensaios, realizados em macrófagos do colostro humano estimulados pela bactéria EPEC e tratados com os complexos PEG/NPs, Gly@PEG/NPs e com Gly pura, mostraram que somente as células tratadas com Gly pura tiveram sua atividade fagocítica aumentada com relação ao grupo controle (estatisticamente relevante - $p < 0,05$). Evidenciando que os complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs não foram reconhecidos pelos macrófagos. Em complemento, foi verificado que somente os macrófagos tratados com o complexo Gly@PEG/NPs tiveram sua atividade microbida aumentada da ordem de 40 %, com relação aos grupos controle ($p < 0,05$). Por último, foi observado que os tratamentos com o complexo Gly@PEG/NPs e com a Gly pura aumentaram a expressão, com relação ao grupo controle, tanto das citocinas anti-inflamatórias (IL – 4 e IL – 10) quanto das pro-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), todas com $p < 0,05$.

Palavras Chaves: Glicina; Nanopartículas de PEG, entrega de drogas, espalhamento Raman intensificado por superfície, citocinas e macrófagos.

Abstract

This study reports on the successful preparation, characterization and biological test *in vitro* of a biocompatible colloidal suspension comprising glycine (Gly) loaded into polyethylene glycol (PEG) nanoparticles (Gly@PEG/NPs) and suspended within PBS. The interaction between the Gly molecule and the PEG nanoparticles was investigated using normal Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), the latter employing silver substrate. Additionally, scanning and transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering, zeta-potential, and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were employed to characterize the samples. The biological activities of the Gly@PEG/NPs complex in human colostrum macrophages stimulated by the bacterium *Escherichia coli* (EPEC) were evaluated for viability, phagocytosis, microbicidal activity and cytokine production. Morphological analyzes revealed that Gly@PEG/NPs have non-spherical shape with average diameter (polydispersion index) of 54.3nm (0.16). Moreover, high-resolution TEM images demonstrated the coexistence of crystalline and amorphous phases in the Gly@PEG/NPs structure. The FTIR, normal Raman and SERS spectra strongly suggest that the protonated amino groups (NH_3^+) of the Gly molecules bind to the oxygen atoms of the PEG molecule by means of hydrogen bonds, leaving the carboxylate groups (COO^-) facing outwards to the bulk aqueous-like medium. Assays using the MTT method (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) in RAW 264.7 cells and human colostrum macrophages treated with the Gly@PEG/NPs complex revealed that the cellular viability of these systems is greater than 85%. Bioassays, performed on EPEC-stimulated human colostrum macrophages and treated with the PEG/NPs and Gly@PEG/NPs complexes and pure Gly, showed that only cells treated with pure Gly had their phagocytosis rates increased, compared to the control group (statistically relevant - $p < 0.05$), showing that the PEG/NPs and Gly@PEG/NPs complexes were not recognized by macrophages. In addition, it was found that only macrophages treated with the Gly@PEG/NPs complex had their microbicidal activity increased of the order of 40%, in relation to the control groups ($p < 0.05$). Finally, it was observed that treatment with the Gly@PEG/NPs complex and pure Gly increased the expression, relative to the control group, of both the anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) and the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), all with $p < 0.05$.

Keywords: Glycine; PEG nanoparticles; Drug delivery; Surface enhanced Raman scattering; cytokines and macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Representação esquemática da produção de citocinas sistema imunológico	33
Figura 3.2- Biossíntese da glicina a partir da serina	38
Figura 3.3- Representação esquemática de polimerização	42
Figura 3.4- Representação esquemática da estrutura química do polietilenoglicol	44
Figura 5.1- Imagem SEM e histograma de tamanho de partícula da amostra 2Gly@PEG/NPs e imagens TEM e imagens HRTEM da amostra 2Gly@PEG/NPs	60
Figura 5.2- Espectros de FTIR das amostras: (i) PEG/NPs, (ii) 2Gly@PEG/NPs, e (iii) Gly livre. (b) ampliação dos espectros de FTIR	63
Figura 5.3- Espectro do Raman normal das amostras: PEG/NPs, Gly@PEG/NPs. Ampliação em diferentes regiões espectrais dos espectros do Raman normal da amostra 2Gly@PEG/NPs e PEG/NPs	64
Figura 5.4- Espectro Raman normal de amostras: solução de Gly, Gly@PEG/NPs e PEG/NPs. Espectro Raman normal de solução de Gly. Zoom, em diferentes faixas espectrais, do espectro SERS de amostras solução de Gly e 2Gly@PEG/NPs espectro Raman normal da solução de Gly	67
Figura 5.5 Ampliações, em diferentes regiões espectrais dos espectros Raman normal dos complexos (i) PEG/NPs e xGly@PEG/NPs	67
Figura 5.6- Representação esquemática da adsorção das moléculas de Gly na cadeia polimérica do PEG	70
Figura 5.7 Espectros SERS (i) e Raman normal (iv) da solução de Gly (0,1 mol/L). Espectros SERS dos complexos xGly@PEG/NPs com x = 1,0 mol/L (ii) e x = 0,1 mol/L (iii)	72

Figura 5.8 Espectros SERS (i) e Raman normal (iv) da solução de Gly (0,1 mol/L)	73
Figura 5.9 – Ampliações, em diferentes regiões espectrais, dos espectros SERS (i) e Raman normal (iv) da solução de Gly (0,1 mol/L)	73
Figura 5.10 – Efeito das concentrações de Gly e Gly @ PEG/NPs na viabilidade das células RAW pelo ensaio de MTT	77
Figura 5.11 – Imagens da atividade fagocítica obtida pelo método de alaranjado de acridina: Fagocitose da EPEC	82
Figura 5.12 - Expressão de citocinas de macrófagos de colostro humano: IL-1 β , IL – 4, IL – 10 e TNF- α após estimulação por EPEC	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Ilustração da Resposta imunológica primária e secundária	29
Tabela 5.1- Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs	61
Tabela 5.2- Posição dos modos vibracionais obtidos do Raman normal e SERS para PEG/NPs, Gly (0.1 mol/L), Gly@PEG/NPs	66
Tabela 5.3- Índice de fagocitose bacteriana e de atividade microbicida por macrófagos do colostro humano determinados por alaranjado acridina	81
Tabela 5.4- Expressão de citocinas (pg/mL) em macrófagos de colostro humano após estimulação por EPEC	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Anova	análise de variância
ANVISA	agencia nacional de vigilância sanitária
AM	atividade microbica
°C	grau celsius
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Cel	célula
DO	densidade óptica
D.O.U	diário oficial da união
Gly@PEG/NPs	nanopartícula de polietilenoglicol adsorvida com glicina
Gly	glicina
IL	interleucina
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-17	interleucina 17
IFN- γ	interferon gama
L	litro
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mmol	milimolar
NMDA	N-metil-d-aspartato
NEC	enterocolite necrotizante
nm	nanômetro
NK	Natural killer
NK-FB	Fator nuclear kapa B
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PDI	índice de poli dispersão
PBS	fosfato bifásico de sódio
PEG	polietilenoglicol
PEG/NPS	nanopartícula de polietilenoglicol
TGI	trato gastrointestinal
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
δ	bending
v	stretching
ω	wagging

ρ
t
“p”

roking
twinting
correlação de pearson

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
Introdução	17
CAPÍTULO 2	26
Objetivos	26
Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO 3	27
Revisão de literatura	27
Conceito e pressupostos da inflamação	27
Inflamação Aguda	28
Resposta Imune	29
Inflamação Crônica	30
Colostro humano	31
Citocinas	32
Aminoácidos	36
Glicina	37
Mecanismos de ação da glicina	39
Polímeros	42
Polimerização	42
Propriedades e características do PEG	42
Polietilenoglicol 6000 (PEG)	43
Sistema de entrega e PEG	44
CAPÍTULO 4	48
Material e métodos	48
Síntese de nanopartículas de PEG	48
Caracterização física dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs	49
Caracterização dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs quanto às suas propriedades físico-químicas	50
Ensaio Biológicos	51
Cultura de células	51
Obtenção de células da linhagem RAW 264.7	51
Obtenção de amostras (macrófagos do colostro humano)	52
Análise in vitro da citotoxicidade dos complexos Gly, PEG/NPs e Gly@PEG/NPs	53
Obtenção da Espécie <i>Escherichia coli</i>	53

Estudos de Imunomodulação e quantificação de citocinas expressas por macrófagos do colostro humano quando tratadas com Gly pura e com os complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs	54
Avaliação da fagocitose e atividade microbicida de macrófagos do colostro humano quando tratadas com os Gly pura e com os complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs	55
Análise estatística	56
CAPÍTULO 5 – REULTADOS E DISCUSSÃO	57
Caracterização Físico-química, morfológica do complexo Gly@PEG/NP	57
Estudo da Estabilidade dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs por DLS	61
Propriedades ópticas dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs	61
Resultado dos estudos de Viabilidade celular do complexo Gly@PEG/NPs	58
Viabilidade celular da Gly e do complexo Gly@PEG/NPs	76
Avaliação do efeito funcional Gly@PEG/NPs	78
Viabilidade Celular – MTT	80
Ensaio de Fagocitose e atividade microbicida	80
Ensaio de Imunomodulação e quantificação de citocinas	83
 CAPÍTULO 6	 91
Conclusão	91
Perspectivas Futuras	92
 CAPÍTULO 7	 93
Referencias	93
 ANEXOS	 108

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Conforme os dados da Coordenação Geral de Informação e Análise Epidemiológica do Ministério da Saúde (CGIAE/SVS/MS), na plataforma do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), em julho de 2015 os casos de óbitos comunicados, em decorrência das doenças inflamatórias (CID 10 – Código Internacional de Doenças) foi da ordem de (1.000.000) um milhão, em 2017 houve um aumento de aproximadamente vinte pontos percentuais (20%), subindo para um total de (1.200.000) milhão e duzentos mil casos de óbitos, devido a complicações das doenças inflamatórias. (Fonte: SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade - Maio de 2017 disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/cid10.show.mtw>).

Os processos inflamatórios fazem parte de aproximadamente 14.000 patologias descritas na classificação internacional de doenças (CID).

A inflamação é uma reação dos tecidos a um agente agressor caracterizado morfológicamente pela saída de líquidos e elementos do sangue, os leucócitos, para a região tecidual (Kumar et al. 2012). Quando ocorre lesão, seja ela causada por fatores intrínsecos, extrínsecos ou até mesmo qualquer outro fenômeno, os tecidos lesados liberam várias substâncias que provocam importantes alterações secundárias no sistema, todas essas alterações teciduais são conhecidas como inflamação (Gomes et al. 2010). No processo inflamatório ocorre dilatação dos vasos sanguíneos por conta do excesso do fluxo local,

aumento da permeabilidade dos capilares, com extravasamento de grande quantidade de líquidos para os espaços intersticiais que podem acontecer pela coagulação nesses espaços, devido às quantidades excessivas de fibrinogênio e outras proteínas que vazam dos capilares, ocorrendo migração de grande número de granulócitos e monócitos para o tecido, o que leva a intumescência das células (Gomes et al. 2010).

Classicamente, a inflamação se divide em três etapas, processos inflamatórios agudos, resposta imune e processos inflamatórios crônicos (Vinay et al. 2015), nesse contexto há infiltração de leucócitos, liberação de enzimas (proteases) e formação de radicais livres de oxigênio na região inflamada (He et al. 2005; Colombo et al. 2015).

Por estar presente em tecidos conjuntivos e no sangue, os macrófagos são importantes na regulação da resposta imune, considerando que são as primeiras células a perceber a presença de agentes invasores. No sistema imunológico possui a função de detectar e fagocitar microrganismos invasores, células mortas e vários tipos de resíduos (Belló et al. 2015).

Os macrófagos são células presentes em várias secreções, e são as principais células envolvidas na proteção para infecções, principalmente as bacterianas. A literatura científica relata eliminação de bactérias por fagócitos, sendo sua atividade microbicida estimulada na presença de agentes imunomoduladores (Goldblum e Goldman 1994; Honorio-França et al. 1997; Mccord 2000; França et al. 2009).

Considerando que o colostro é uma secreção que contém componentes imunologicamente ativos, células imunocompetentes como os macrófagos, estudos têm mostrado que o colostro e o leite humano contém componentes solúveis e celulares com atividade anti-infecciosa para vários micro-organismos (Honorio-França et al. 1997; Honorio-

França et al. 2001; França-Botelho et al. 2006; França et al. 2010; França et al. 2011; França et al. 2012).

Contido no sistema imunológico estão as citocinas, são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células, como macrófagos, e têm função de agir na própria célula produtora, em células próximas ou via endócrina, quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação (Sommer e White 2010; Zhang 2007; Cruvinel et al. 2010).

Na doença celíaca, conhecida como Enteropatia sensível ao glúten, ocorre a desordem gastrintestinal autoimune, que aumenta a produção de linfócitos intra-epiteliais e potencializa a resposta imunológica causando uma inflamação aguda (Guimarães et al. 2013). Já para o caso da Enterocolite Necrotizante (NEC), há relatos na literatura que, além do trato gastrointestinal, outros órgãos são envolvidos (Meyer et al. 2006). No sistema digestório, a inflamação é controlada por células T que reconhecem organismos estranhos ao corpo (Meyer et al. 2006).

Isso ocorre devido a liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea, como os produtos da peroxidação lipídica, os quais podem levar à disfunção e falência de vários órgãos, deterioração das funções cardiovascular, respiratória, renal, hepática e hematológica (Meyer et al. 2006).

A gravidade e o prognóstico da (NEC) estão correlacionados com o número de sistemas envolvidos (Insuficiência respiratória, diminuição da reperfusão periférica e colapso circulatório) (Meyer et al. 2006). Além do mais, os radicais livres derivados do oxigênio desempenham um papel importante como imunomodulador e podem participar no

desencadeamento da (NEC). Esses radicais lesam o tecido via peroxidação de lipídeos insaturados presentes na membrana mitocondrial e celular (Christiansen 2013; Souren 2013).

Neste contexto, existem alguns aminoácidos, como a glicina (Gly), que está sendo utilizada no tratamento de pacientes que sofrem de enterocolite, esquizofrenia, doença celíaca e processos inflamatórios, pois possui ação citoprotetora, imunomoduladora e anti-inflamatória (Zhong et al. 1998; Evins 2000; Meyer et al. 2006; Maccole 2010; Guimarães et al. 2013a). Além do mais, a glicina em sido amplamente utilizada como suplemento funcional usado na indústria farmacêutica, dermatológica e nutricional (Zhong et al. 1998; Maccole 2010).

No caso da glicina (Gly) o código genético tem a informação necessária para sua fabricação, atua na composição das proteínas e possui um sabor adocicado, atua como um neurotransmissor na retina, medula espinhal e sistema nervoso central (SNC), importante para que ocorra a diferença de potencial na célula para favorecer o impulso nervoso e levar as informações necessárias a diversas partes do corpo. É um aminoácido que pode ser disperso em ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos (Furukawa et al. 2005).

Além disso, a Gly proporciona um efeito anti-inflamatório, imunomoduladores e citoprotetores (Zhong et al. 1998; Guimarães et al. 2013a; Razak et al. 2017). Nesse sentido, a Gly desempenha um papel fundamental na melhoria da saúde, beneficiando o crescimento e bem-estar dos mamíferos, especialmente em humanos. Como ela é sintetizada pelo organismo, é considerada não essencial. No entanto, alguns estudos mostram que quantidade de Gly produzida *in vivo* é insuficiente para as atividades metabólicas normais em alguns mamíferos, incluindo humanos (Wu 2010; Wang et al. 2013).

A falta ou deficiência na síntese de glicina no organismo, ou na suplementação pode provocar alguns problemas de próstata, enfraquecimento do sistema imunológico, baixo nível de crescimento, problemas musculares e de demora na restauração dos tecidos (Sousa Sá 2010).

Deve-se considerar que alguns suplementos em certas doses conforme as necessidades e recomendações nutricionais diárias, podem prevenir deficiências orgânicas e atuar como agente farmacológico (Figueiredo et al. 2009). Esses nutrientes podem agir por eles mesmos ou interagir com outros compostos bioativos (Figueiredo et al. 2009). Nesse sentido a glicina é considerada imunonutriente. Estudos em modelos animais mostraram que a glicina atua como moduladora da cascata inflamatória sistêmica (Figueiredo et al. 2009).

A ciência e a tecnologia em escala nanométrica compõem atualmente um campo de fronteira multi e interdisciplinares, conhecido como nanociência e nanotecnologia (Ferrari 2005). Em nanotecnologia a habilidade de trabalhar em nível molecular, átomo por átomo, para criar estruturas com organização controlada, tem levando ao entendimento e domínio sem precedentes de propriedades fundamentais da matéria (Paz et al. 2012).

Como consequência, a nanociência e a nanotecnologia formam um campo de grandes desafios científicos e de inúmeras aplicações tecnológicas (Azevedo 2002). Devido ao advento da nanotecnologia, grandes avanços na ciência estão sendo possíveis em diversas áreas, tais como: energia, saúde, química entre outras, as quais vem abrindo uma ampla possibilidade de aplicações (Ferrari 2005).

Muito embora haja esforços sistematizados para o fomento e disseminação das atividades em nanociências e nanotecnologia, já ocorrem muitos estudos em vários países há mais de 20 anos (Santos et al. 2013). Entretanto, é reconhecido pela comunidade científica e

tecnológica internacionais, bem como pelos órgãos correspondentes de fomento à Ciência e Tecnologia, que a nanociência está ainda em sua infância e podem ser consideradas como emergentes (Azevedo 2002; Santos et al. 2013).

O desenvolvimento de nanomateriais para aplicações biomédicas tem sido um dos principais tópicos em nanotecnologia nos últimos anos (Laurent et al. 2008; Khlebtsov and Dykman 2011). Dada a variedade de processos biológicos que ocorrem em escala nanométrica, as propriedades físico-químicas desses nanomateriais os tornam excelentes candidatos para aplicações biomédicas em nível celular e sub-celular, fornecendo abordagens revolucionárias para diagnóstico, prevenção e tratamento de uma ampla faixa de doenças (Paz et al. 2102; Kreuter, 2014; Okur et al. 2016, Veloso et al. 2017). Avanços recentes na tecnologia de colóides, fabricados a partir de composições químicas diversificadas, que vão desde semicondutores, metais, óxidos metálicos, sílica e polímeros, levaram à produção de nanopartículas de alta qualidade, que impactaram no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, abordagens de liberação de drogas e avançados agentes de imagem (Kreuter 2014; Smith e Gambhir 2017). No entanto, para tornar os sistemas coloidais altamente sofisticados e biocompatíveis, é geralmente necessária uma engenharia de superfície sofisticada.

Polímeros são moléculas naturais ou sintéticas, caracterizadas pela repetição múltipla de uma ou mais espécies de átomos ou grupos de átomos, ligados uns aos outros em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades, são versáteis, podem ser aplicados em diversas áreas, como excipientes (substância farmacologicamente inativa usada como veículo para o princípio ativo) em preparações para medicamentos (Villanova et al. 2010; Ozório et al. 2015).

Polietilenoglicol (PEG) é um polímero hidrofílico, biodegradável e biocompatível, cuja denominação química é 1,2-di-hidroxiopropano (Huang et al. 1999; Park e Kim 2004). Na literatura, o PEG é um dos agentes de revestimento biocompatíveis mais comuns (Laurent et al. 2008). O PEG não é tóxico, não é imunogênico, solúvel em água e já aprovado pela Food and Drug Administration dos EUA para alimentação e vários usos clínicos (U.S. Food and Drug Administration, 2018).

O PEG tem atraído considerável interesse em aplicações biomédicas em áreas como liberação controlada de biomoléculas, na cicatrização de feridas, liberação de medicamentos e plataformas para medicina regenerativa.

Os nanomateriais, quando têm suas superfícies modificados com PEG (denominado PEGilação) e administrados na corrente sanguínea, podem suprimir a adsorção por opsonina e a depuração subsequente pelo sistema fagocitário mononuclear, prolongando assim o tempo de circulação e influenciando a farmacocinética e a biodistribuição dos sistemas de administração de fármacos (Dorati et al. 2007; Kumari et al. 2010; Corrêa et al. 2011; Hara et al. 2013; Machado et al. 2015).

Embora seja amplamente utilizado para funcionalizar uma enorme diversidade de materiais nanométricos, o próprio PEG como o principal componente na fabricação de nanomateriais bioativos ainda não é extensivamente explorado (Qiu et al. 2013; Okur et al. 2016).

Assim, para tornar os nanocarreadores baseados em PEG mais eficiente, é importante não somente determinar suas características físico-químicas (como forma, tamanho e carga superficial), mas também é obrigatório avaliar e controlar tanto a eficiência da nanoencapsulação da droga quanto o mecanismo de interação da droga com o molde

polimérico durante o carregamento. No entanto, a determinação desses parâmetros é um enorme desafio, particularmente ao avaliar as informações em suspensões coloidais com baixa concentração de moléculas bioativas (Santos et al. 2011; Paz et al. 2012).

A espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) tem emergido como uma poderosa ferramenta analítica para detecção sensível e seletiva de espécies adsorvidas na vizinhança de nanoestruturas de metais nobres, como prata e ouro, levando ao desenvolvimento de espectroscopia Raman ultrasensível (Zrimsek et al. 2013). De fato, o efeito SERS tem sido amplamente utilizado para estudar a adsorção de Gly em superfícies de ouro e prata (Kang et al. 2013; Parameswari et al. 2016). Contudo, é do nosso conhecimento que o efeito SERS tem sido pouco utilizado em pesquisa sobre a interação entre biomoléculas adsorvidas por nanopartículas poliméricas.

Com o objetivo de cobrir esta lacuna na literatura, o primeiro objetivo dessa tese é sintetizar, caracterizar e avaliar a adsorção de Gly por nanopartículas de PEG (Gly@PEG/NPs) utilizando espectroscopia Raman e SERS. Para isso, o sistema complexo PEG/NPs carregados com diferentes quantidades de Gly (xGly@PEG/NPs) será também caracterizado por espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Além disso, a fim de verificar a citotoxicidade do sistema, o complexo xGly@PEG/NPs foi submetido a bioensaios por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio). Nesse experimento avaliou-se a viabilidade celular durante a incubação de células RAW 264.7 (macrófagos de camundongos) quando submetidos a diferentes conteúdos do complexo Gly@PEG/NPs e Gly pura.

A segunda parte dessa tese tem como o objetivo de estudar o efeito funcional do complexo Gly@PEG/NPs na atividade microbicida, fagocítica e de produção de citocinas pelo macrófago de colostro humano. Para isso, ensaios de viabilidade celular MTT e ensaios de fagocitose e de produção de citocinas estimuladas pela bactéria *Escherichia coli* (EPEC) foram realizados.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho é preparar, caracterizar e testar material funcional a base de glicina adsorvida em nanopartículas de polietilenoglicol (NP-PEG/Gly) para aplicação biotecnológica.

2.2 Objetivos Específicos

- ▶ Preparar e caracterizar o complexo Gly@PEG/NPs, quanto ao tamanho, carga superficial adsorção de Gly e estabilidade;
- ▶ Avaliar a citotoxicidade do complexo Gly@PEG/NPs em células do sistema imunológico;
- ▶ Avaliar o efeito do complexo Gly@PEG/NPs na atividade microbicida e fagocítica em macrófago de colostro humano estimulados pela bactéria *Escherichia coli* (EPEC);
- ▶ Avaliar o efeito do complexo Gly@PEG/NPs na expressão de citocinas em macrófago de colostro humano estimulados pela bactéria *Escherichia coli* (EPEC).

CAPITULO 3

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conceito e pressupostos sobre Inflamação

A inflamação (do Latim *inflammatio*, atear fogo) ou processo inflamatório, é uma reação dos tecidos a um agente agressor (Kumar et al. 2012), as principais características da inflamação são: Dor, hiperalgesia (sensibilidade exagerada), eritema (rubor, vermelhidão), edema (acúmulo anormal de líquido no compartimento extracelular) e limitação funcional (perda das funções). Agentes inflamatórios promovem a síntese de moléculas sinalizadoras que induzem os mediadores inflamatórios, resultando em saída de plasma e leucócitos dos vasos, os quais estimulam o reparo dos danos produzidos pelas agressões (Kumar et al. 2012).

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (Halliwell 1994; Bianchi e Antunes 1999). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Bianchi e Antunes 1999; Pompella 1997). Algumas espécies de radicais livre já descritos na literatura: ($^1\text{O}_2$) Oxigênio singlete (O_2^-) Radical superóxido ($\text{OH}\cdot$) Radical hidroxila, (NO) Óxido nítrico (ONOO^-) Peroxinitrito. Esses radicais livres podem ser gerados no citoplasma celular e ter

como objetivo as proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA de acordo com o seu sítio de atuação (Anderson 1996; Bianchi e Antunes 1999).

De acordo com a literatura, a geração de radicais livres tem sido considerada um importante mecanismo de proteção durante os processos infecciosos (França et al. 2011a; França et al. 2011b). Várias plantas, hormônios e aminoácidos como a glicina têm mostrado capacidade de induzir a ativação do sistema imune com liberação de radicais livres, conferindo proteção para uma variedade de doenças como a inflamação (Villanova et al. 2010).

A inflamação tem uma história antiga e rica, intimamente relacionada com histórias das guerras e feridas, por se tratar de um mecanismo de defesa natural do organismo a qualquer agressão eventualmente sofrida. Sua intensidade mostra-se diretamente proporcional ao tamanho do trauma sofrido. A resposta inflamatória costuma ser dividida em três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica (Katsung 1998; Colombo et al. 2015). Ainda pode-se classificar a inflamação em dois tipos principais, conforme sua velocidade de instalação: aguda e a crônica (Vinay et al. 2005). Esta classificação não diz respeito à gravidade do processo, mas apenas, com a velocidade de instalação. Assim, podem existir processos inflamatórios agudos de baixo ou alto grau de gravidade, o mesmo ocorrendo com a inflamação crônica (Vinay et al. 2005; Colombo et al. 2015).

3.1.2 Inflamações Aguda

Inflamação aguda é aquela que se instala rapidamente, como por exemplo, após um acidente onde ocorre lesão tecidual de forma súbita. A inflamação aguda refere-se à resposta

inicial à lesão tecidual, sendo mediada pela liberação de autacóides (substâncias produzidas por células que agem em outros órgãos) e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune (Alle e Filho Alle 1992). A reação inflamatória aguda caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais, o aumento no fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular na região afetada, a exsudação de fluido (edema), a dor localizada, a migração e o acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, a formação de tecido de granulação e reparo tecidual (Gomes-Leal 2002).

3.1.3 Resposta Imune

A resposta imune aparece quando as células imunologicamente competentes são ativadas, resumo na tabela (3.1) reagindo a organismos estranhos ou substâncias antigênicas, liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. Por outro lado, o resultado pode ser deletério, se resultar em uma inflamação crônica sem reparação (Katsung 1998). Este processo pode se prolongar em um mecanismo de retroalimentação extremamente danoso ao organismo.

A síndrome de resposta inflamatória sistêmica é um complexo de resposta do hospedeiro a uma variedade de insultos clínicos, geralmente levando a uma patologia grave (Katsung 1998). Resumidamente resposta imunológica:

Tabela 3.1: Resposta imunológica primária e secundária

<i>Primária: 1º contato</i>	<i>Secundária: 2º contato</i>
Ativa: Recebe antígenos	Passiva: Recebe produtos da resposta imune
Inata: Resposta primária	Adaptativa: Diferentes formas de reação
Humoral: Linfócito B	Celular: Linfócito T

3.1.4 Inflamação Crônica

Inflamação crônica se instala de forma lenta e insidiosa, como nas doenças reumatológicas tais como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico. A inflamação crônica pode se instalar dentro de semanas ou meses, e é caracterizada por inflamação ativa (infiltrado de células mononucleares), com destruição tecidual e tentativa de reparar os danos da cicatrização (Robbins et al. 2010). Pode ser a continuação de uma reação aguda, mas, muitas vezes ocorre como uma reação pouco intensa e, frequentemente, assintomática. Os macrófagos ativados secretam vários mediadores da inflamação, os quais, se não controlados, podem levar à destruição tecidual e fibrose, características desse tipo de inflamação (Robbins et al. 2010).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta aguda. Em um processo inflamatório a região atingida fica avermelhada e quente. Isso ocorre devido a um aumento do fluxo de sangue e demais líquidos corporais migrados para o local (Assumpção et al. 1999; Colombo et al. 2015). Na área inflamada também ocorre o acúmulo de células provenientes do sistema imunológico (leucócitos, macrófagos e linfócitos), com dor localizada mediada por mediadores químicos produzidas pelo organismo (Assumpção et al. 1999).

No processo, os leucócitos destroem o tecido danificado e enviam sinais aos macrófagos, que ingerem e digerem os antígenos e o tecido morto. Em algumas doenças esse processo pode apresentar caráter destrutivo. A inflamação pode também ser considerada como parte do sistema imunitário, o chamado sistema imune inato, assim denominado por sua

capacidade para deflagrar uma resposta não específica contra padrões de agressão previamente e geneticamente definidos pelo organismo agredido (Scheppach 1996).

Esta definição se contrapõe à da imunidade adquirida, ou seja, aquela onde o sistema imune identifica agentes agressores específicos segundo seu potencial antigênico. Nesse último caso, o organismo precisa entrar em contato com o agressor, identificá-lo como estranho e potencialmente nocivo e a partir de então produzir uma resposta (Scheppach 1996).

Evidências de estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que o estado de inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade tem sua origem na relação existente entre o tecido adiposo e o sistema imunológico (Fujimori et al. 2015). No diabetes esta inflamação também tem associado a várias disfunções metabólicas e imunológicas, que contribuem para o aumento na incidência e severidade de doenças infecciosas. A inflamação é regulada no local e via sistêmica por vários sinais bioquímicos e hormonais (Honorio-França et al. 1996).

Os mediadores químicos envolvidos na fisiopatologia da inflamação modulam o balanço da resposta imune, no caso as citocinas (Sommer 2010).

3.1.4.1 Colostro Humano

O leite humano não é somente importante para a nutrição, é também importante para a defesa imunológica de neonatos. Possui um equilíbrio adequado de nutrientes, fornecendo de forma altamente biodisponível e digerível uma variedade desses nutrientes. O colostro, a primeira secreção láctea, contém os nutrientes necessários para o crescimento de lactentes e fornece quantidades adequadas em lipídios, carboidratos, proteínas, hormônios, aminoácidos

e células imunocompetentes tais como linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e sua eliminação do organismo. Na maioria das espécies, os leucócitos (entre eles os macrófagos) são as células predominantes, constituindo assim, primeira barreira imunológica contra patógenos que se comunicam por meio das citocinas (Honorio-França et al. 2013).

3.1.5 Citocinas

Citocinas é um termo genericamente utilizado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos, entre outras (Sommer 2010). As citocinas são polipeptídios ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa, são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão (inflamação) e por células do sistema imunológico por meio da ativação de proteinoquinases por uma substância que estimula a proliferação celular e podem induzir mitose em macrófagos ao ligar-se a glicoproteínas da membrana destas células (Sommer 2010; Oliveira et al. 2011; Guimarães et al. 2017).

A produção de citocinas é um evento breve e autolimitado, uma vez sintetizadas pela transcrição de genes codificados por RNA mensageiros, são rapidamente secretadas, quando necessárias (Abbas 2005). As razões que determinam a secreção de determinado padrão de citocinas frente ao estímulo ainda não estão bem esclarecidas. As principais fontes de citocinas são: APC (células apresentadoras de antígenos), células endoteliais e epiteliais,

linfócitos T, estroma da medula óssea, leucócitos, fibroblastos, queratinócitos, plaquetas e macrófagos.

Enfim, tanto células linfoides quanto não linfoides (Ciprandi et al. 2005). As citocinas são formadas em cascata, de modo que uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (ver Fig 3.1) (Zhang 2007; Oliveira et al. 2011). Nesse processo, essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam os processos de transcrição genética. Dessa forma, as citocinas influenciam na diferenciação, proliferação e na sobrevivência da célula do sistema de defesa, também regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar ou atenuar a resposta inflamatória (Zhang 2007; Guimarães et al. 2017).

Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas (Lin et al. 2000; Sommer 2010). Atuam especialmente em células vizinhas e nas próprias células produtoras (Oliveira et al. 2011). Uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas (Oliveira et al. 2011; Guimarães et al. 2017).

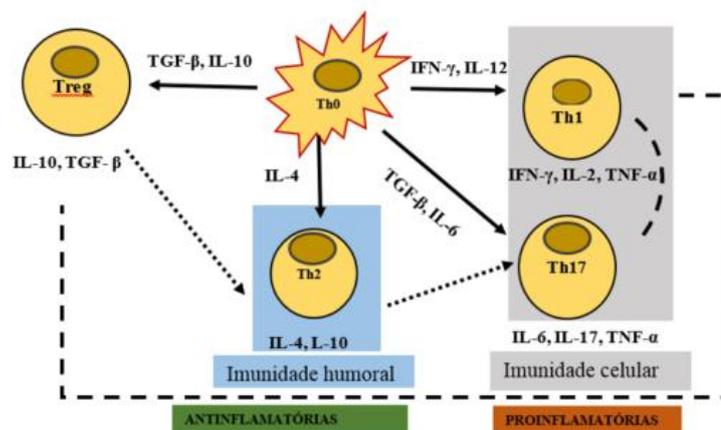


Fig. 3.1 – Representação esquemática da produção de citocinas pelo sistema imunológico

Cada citocina tem uma função específica, a maioria delas está envolvida na ativação ou supressão do sistema imunológico na indução de divisão de outras células, também possuem função na memória e são usadas como medicamento atuando em concentrações baixas, costumeiramente sua síntese ocorre após estimulação por toda substância que ao entrar em um organismo que seja capaz de se ligar a anticorpos ou a receptor de célula B (Curfs et al. 1997; Zhang 2007).

As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN-), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α TNF- β), e fator de transformação de crescimento (TGF- β) (Sommer 2010; Guimarães et al. 2017). Algumas citocinas podem ter ações pró-inflamatórias (Th1- T helper cell 1) ou anti-inflamatórias (Th2 - T helper cell 2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e FNT (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (fator transformador de crescimento β) (Curfs et al. 1997; Sommer 2010; Oliveira et al. 2011; Leal et al. 2018). Em nosso trabalho avaliamos algumas delas, conforme descrito a seguir. Resumidamente:

IL-2 Pró-inflamatória, contribui para a geração e a propagação de respostas imunológicas específicas do antígeno (Protti et al. 2013)

IL-6 Pró-inflamatória, promove maturação e ativação de macrófagos, diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células natural killer (NK) (Paz-Filho et al. 2012)

IL-12 Pró-inflamatória, estimula produção de IFN- γ , TNF e diminui a produção de IL-4 e IL-10, atua na diferenciação em linfócito T auxiliar tipo 1 e aumenta a atividade dos linfócitos T citotóxicos e NK (Gomes et al. 2014)

IL-17 Pró-inflamatória, são produzidas por Linfócitos T auxiliar tipo 17 e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6) (Lin et al. 2018)

TNF- α Pró-inflamatória, atua como pró-inflamatória capaz de provocar a morte de células (apoptose) tumorais, com uma vasta gama de ações pró-inflamatórias, é secretado principalmente por macrófagos, no caso de mau funcionamento pode causar inflamações dolorosas, choque séptico, febre e citotoxicidade (Lin et al. 2018).

IL-1 β Pró-inflamatória, são moléculas proteicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imune, possuem função na própria célula produtora, em células próximas e à distância. Atua na produção de inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2 (Gazzani e Grusak 2012).

IFN- γ Pró-inflamatória, é produzido por linfócitos T e células NK quando estimulados por IL-12 ou IL-18, responsável por ativar macrófagos, regula a resposta inflamatória, potencializa outros interferons e modula a atividade dos linfócitos B, são mediadores da imunidade inata e da inflamação (Oliveira et al. 2011)

IL-4 Anti-inflamatória, produzida por linfócitos-T-CD4, trata-se de uma glicoproteína que tem na sua proliferação e diferenciação um importante papel em processos inflamatórios das vias aéreas, pois estimula síntese de Imunoglobulinas (Oliveira Júnior et al. 2016).

IL-10 Anti-inflamatória, inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6, são produzidas por macrófagos. Possuem características regulatórias e auto regulatórias, sendo estimulada a produzir mais IL-10 (Houschyar et al. 2016)

IL-8 Quimiotática, por apresentar locomoção orientada e unidirecional ao longo de um gradiente químico, causado pela diferença de concentração de determinadas substâncias denominadas quimiotratores ou agentes quimiotáticos, que podem ser liberadas por tecidos lesados, geradas por sistemas enzimáticos presentes no plasma, formadas durante reações imunes ou liberadas por microrganismos (Cruvinel et al. 2010)

3.2 Aminoácidos

Aminoácidos são compostos quaternários de carbono (C), hidrogénio (H), oxigénio (O) e nitrogénio (N) às vezes contêm enxofre (S), como a cisteína. A estrutura geral dos aminoácidos envolve um grupo amina e um grupo carboxilo, ambos ligados ao carbono α . O carbono α também é ligado a um hidrogénio e a uma cadeia lateral, que é representada pela letra R. O grupo R determina a identidade de um aminoácido específico (Hitchcock et al. 2006).

Os aminoácidos são classificados em polares, não polares e neutros, dependendo da natureza da cadeia lateral existem 20 aminoácidos principais, sendo denominados aminoácidos primários ou padrão, mas, além desses, existem alguns aminoácidos especiais, que só aparecem em alguns tipos de proteínas (Pires et al. 2006).

Desses 20, nove são ditos essenciais: isoleucina, leucina, valina, fenilalanina, metionina, treonina, triptofano, lisina e histidina. O organismo humano não é capaz de produzi-los, e por isso é necessária à sua ingestão através dos alimentos para evitar a sua deficiência no organismo (Pires et al. 2006). Os aminoácidos são moléculas anfóteras, ou seja, podem se comportar como ácido ou como base, liberando respectivamente nesta ordem (H^+) ou (OH^-) em uma reação química (Pérez e Labanda 2013)

Para que as células possam produzir suas proteínas, elas precisam de aminoácidos, que podem ser obtidos a partir da alimentação ou serem produzidos pelo próprio organismo. Os aminoácidos podem ser classificados quanto ao radical e quanto ao seu destino, neste caso, a glicina pode ser considerada um suplemento nutricional (Tassinari et al. 2017).

3.2.1 Glicina

Em 1965, Aprison e Werman descobriram que a concentração da glicina na medula espinhal era bastante elevada. Associando este fato ao publicado alguns anos antes por Curtis e Watkins, que mostraram a aplicação de glicina em neurônios da medula espinhal, onde se originava uma inibição da transmissão sináptica, a transmissão é geralmente química, e o impulso no axônio pré-sináptico causa liberação de um neurotransmissor na terminação pré-sináptica. Este mediador químico é liberado na fenda sináptica e se liga a receptores específicos na célula pós-sináptica. Em algumas sinapses, a transmissão é puramente elétrica e em outras é elétrica-química (Curtis e Watkins 1960), começaram a surgir indícios de que a glicina poderia ter um importante papel como neurotransmissor.

A glicina pode participar em diversos processos metabólicos e é sintetizada a partir da glucose, apesar do seu precursor imediato ser a serina (ver Fig. 3.2) (Siegel et al. 1989). Por sua ação nos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), glicina tem uma ação excitatória. No entanto, quando atuando em receptores específicos de glicina, tais como são vistos na medula, a glicina tem efeito inibitório. Estes receptores aumentam a condutância de cloro.

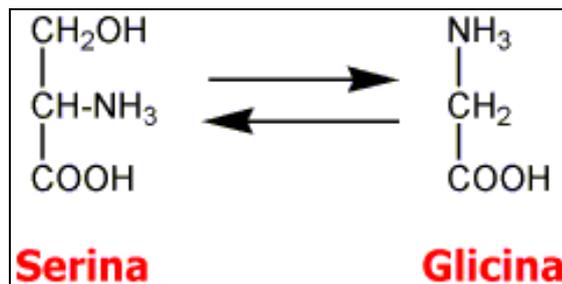


Figura 3.2- Biossíntese da glicina a partir da serina pela enzima serina-hidroxi-metil-transferase, ambas as fórmulas estruturais (serina e glicina) representam o estado de ionização que predomina a pH 7. A fração selecionada (rosa) identifica o grupo R característico de cada um dos aminoácidos, enquanto que a restante estrutura é comum a todos eles, adaptado (Nelson e Cox 2000).

A glicina é um aminoácido simples, presente em vários alimentos, não essencial, formado por uma molécula de carbono ligada a um grupo amina e a um grupo carboxil, com a fórmula molecular $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ e massa molar de: 75,07 g/mol e solubilidade de 225g/L (Davis et al. 1993; Davis et al. 1994; Zhong et al. 1998; Reeds et al. 2007).

A dose descrita de glicina a ser utilizada para prevenção da lesão causada por isquemia e reperfusão intestinal é de 0,5 a 3 mg por grama de peso corporal (Davis et al. 1993; Zhong et al. 1998; Lee et al. 2001; Zhong et al. 2003), sua função na medula espinhal é mediada por interneurônios inibitórios chamados de células de Renshaw. Estas células são ativadas por motoneurônios colaterais e inibem sua ativação e, são importantes porque limitam a ativação dos motoneurônios permitindo o relaxamento muscular (Lee et al. 2001; Zhong et al. 2003).

3.2.2 Mecanismos de ação da Glicina

Ela tem efeito anti-inflamatório, imunomodulador e citoprotetor, protege contra o choque causado tanto por hemorragia como por endotoxinas (Zhong et al. 1998), previne a lesão por isquemia de reperfusão (retorno do sangue aos órgãos e locais privados dele) em uma variedade de órgãos e em tecidos como fígado, rim, coração, intestino e músculo esquelético; e diminui a lesão renal e hepática causada por drogas (Zhong et al. 1998; Zhong et al. 2003).

O mecanismo proposto para a atuação da glicina é pela supressão da sinalização do cálcio, pois a membrana plasmática ativa o canal de cloro que estabiliza ou hiperpolariza o potencial da membrana, e como consequência bloqueia a entrada de cálcio intracelular que iria estimular o efeito cascata de produção de citocinas, causando inibição das células que ativam o processo inflamatório, muito provavelmente bloqueando a ativação de NF-KB (Fator nuclear kappa *Beta*) e TNF- α (Fator de necrose tumoral *Alfa*) (Zhong et al. 2003), levando a diminuição de radicais livres e outros mediadores (Mauriz et al. 2001).

A dose descrita de glicina usada para a prevenção de lesões é de 0,5 a 3 mg por quilograma de peso corporal (Davis et al. 1993; Davis et al.1994; Zhong et al. 1998).

Na literatura também tem relatado os efeitos da glicina na enterocolite necrotizante ECN (Chinen et al. 2010), uma doença inflamatória intestinal que atinge recém-nascidos prematuros (Lee et al. 2002). Sabe-se que no colostro contém glicina e ela atua como agente anti-inflamatório, podendo ser uma alternativa para terapêuticas em processos infecciosos e/ou inflamatórios (Fagundes et al. 2012). É provável que a glicina presente na secreção (Colostro) seja um importante mecanismo de proteção para inflamações gastrointestinais.

A síntese de proteínas acontece somente nos ribossomos, no interior da célula. No entanto, centenas de tipos diferentes de proteínas possuem funções no meio extracelular como anticorpos, hormônios, enzimas e proteínas estruturais. As proteínas secretadas são sintetizadas no interior da célula e chegam no ambiente extracelular por meio de uma vesícula de transporte e de secreção. A síntese e secreção celular desempenham papel fundamental em mecanismos como: moléculas essenciais para a defesa (citocinas) são sintetizadas e secretadas por diferentes células deste sistema (Houschyar et al. 2016; Oliveira Júnior et al. 2016).

Estudos em modelos animais mostraram que a glicina atua como moduladora da cascata inflamatória sistêmica (Figueiredo et al. 2009). Contudo, a dieta pode ser importante na saúde humana e na etiopatogenia de várias doenças, nesse sentido, a glicina é considerada um imunonutriente (Leandro et al. 2006).

Além do valor nutricional os alimentos são considerados também por os seus efeitos potenciais na prevenção e/ou proteção contra doenças crônicas graves, síndrome metabólica, e processos inflamatórios (Gazzani e Grusak 2012).

A glicina é um aminoácido que exibe importantes atividades biológicas, melhora a microcirculação e auxilia na inibição de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β) (Figueiredo et al. 2009; Hartog et al. 2007).

Estudos em suínos, mostraram que os efeitos benéficos de alguns imunonutrientes podem proteger os tecidos de inflamação e lesão por agentes endógenos e exógenos por exemplo, peróxido de hidrogênio e lipopolissacarídeos (LPS) pode resultar, em parte, a partir da sua ação na regulação do metabolismo de aminoácidos nas células para favorecer a síntese de glutathione (um antioxidante importante de baixo peso molecular) a partir de cisteína, glicina e glutamato (Wang et al. 2015).

Estudos em ratos mostraram que o tetra-peptídeo leucina-glutamina-glicina-valina-β (LQGV) relacionado a cadeia de gonadotrofina coriônica humana reduz hemorragia e síndrome da resposta inflamatória sistêmica induzida por (LPS), contudo, seus mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos (Zee et al. 2010). Por meio da combinação *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* demonstrou-se que LQGV estimula ativamente a produção de corticosterona em ratos e assim suprime a inflamação *in vivo* (Zee et al. 2010).

A glicina já demonstrou sua capacidade de proteger o intestino contra a lesão causada por isquemia e reperfusão em modelos de oclusão mesentérica e em transplantes de intestino (Mangino et al. 1996; Zhong et al. 2003). Ela é considerada um agente anti-inflamatório, imunomodulador e com função citoprotetora direta (Lee et al. 2002; Zhong et al. 2003), em experimento com animais em que se provocou oclusão da artéria mesentérica, demonstrou-se que a infusão mesentérica local de glicina aumentou o conteúdo proteico e o DNA da mucosa, diminuiu a atividade da mieloperoxidase intestinal, e manteve a atividade da glutaminase na mucosa (Kallakuri et al. 2003).

Outros dois estudos, também com um modelo de isquemia e reperfusão intestinal em ratos, demonstrou o efeito protetor da glicina, usada em infusão intravenosa sistêmica, ao diminuir a apoptose celular (Jacob et al. 2003) e preservar a integridade e contratilidade da parede intestinal (Kallakuri et al. 2003).

A glicina é facilmente administrada por meio de suplementação e infusões intravenosas de manutenção basal do metabolismo ou como componente de soluções de nutrição parenteral total, pode também ser utilizada por via oral, tendo sido observada uma excelente resposta nos diferentes estudos realizados (Zhong et al. 1998; Jacob et al. 2003).

3.3 Polímeros

Polímeros são moléculas naturais ou sintéticas, caracterizadas pela repetição múltipla de uma ou mais espécies de átomos ou grupos de átomos, ligados uns aos outros em quantidades suficientes para fornecer um conjunto de propriedades (Andrade 2002). São versáteis, podem ser aplicados em diversas áreas e são empregados como excipientes de preparações medicamentosas (Villanova et al. 2010).

3.3.1 Polimerização

Os polímeros naturais são aqueles que já existem normalmente na natureza, enquanto que os sintéticos são compostos orgânicos produzidos por reação de polimerização de moléculas simples. São obtidos pela união de monômeros à molécula em crescimento, uma de cada vez. A sua produção é feita de modo a se formarem longas cadeias orgânicas (Salvador 2000).



Fig. 3.3 – Formação do polímero sintético (Salvador 2000)

3.3.2 Propriedades e características do PEG 6000

Em tamanhos abaixo de 100.000 Da, o PEG é considerado anfifílico e são solúveis em água assim como em muitos solventes orgânicos, incluindo cloreto de metileno, etanol,

tolueno, acetona e clorofórmio (Chen et al. 2011). Isto permite a montagem de PEG na superfície dos íons usando uma variedade de mecanismos químicos que requerem o uso de solventes, seja aquoso ou orgânico (Chiou e Riegelman 1971; Ford 1986). Estes materiais estão disponíveis numa vasta gama de peso molecular que variam de líquidos à temperatura ambiente (PEG200-600), semissólidos (PEG1500), sólidos semicristalinos (PEG3000-20.000) resinosos e sólidos para maior peso molecular > 100.000 (Chiou e Riegelman 1971; Ford 1986).

Biocompatibilidade do PEG: Trata-se de um polímero linear, sintético e biocompatível com o sistema biológico, que pode ser preparado com uma vasta gama de tamanhos e grupos funcionais terminais (Mahato 2004; Chen et al. 2011). São moléculas neutras, hidrofílicas em fluidos biológicos, os quais ajudam a melhorar o tempo de circulação no sangue e dispersividade. Durante décadas variações deste polímero têm sido usado clinicamente como excipientes em formulações farmacêuticas aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (Fuertes e Abuchowski 1990).

3.3.3 Polietilenoglicol 6000 (PEG)

O Polietilenoglicol (PEG) consiste numa mistura de polímeros de fórmula química geral $\text{H-OCH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ com uma massa molecular relativa média da ordem de 6000. Sua fórmula química é $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n \text{H}_2\text{O}$ (n = número de unidades de óxido de etileno que correspondem a uma massa molecular de 6000 u.m.a. (Unidade de massa atômica), ou seja, cerca de 140) e massa: 76,10 g/mol descrito como sólido branco ou esbranquiçado de aparência cerosa ou parafínica. Muito solúvel em água, com intervalo de fusão entre 55°C e 61°C, e índice de refração: $[\text{n}]_D^{20}$: 1,431-1,433, temperatura de ignição 420°C, solubilidade

em água: 550 g/l, apresenta excelente versatilidade, sendo usado na área farmacêutica, biomédica, alimentos, química, física e engenharia (Huang et al. 1999; Park e Kim 2004; Chen et al. 2011).

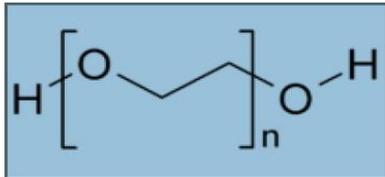


Figura 3.4- Estrutura química do polietilenoglicol (Salvador 2000)

3.3.4 Sistemas de entrega e Polietilenoglicol

Há uma importância nos sistemas de liberação de princípios ativos, pelo fato de que dificilmente um fármaco administrado em um organismo consegue atingir um alvo específico em concentrações adequadas para promover o efeito terapêutico necessário, isso se deve aos obstáculos naturais de diversas naturezas como: anatômicos, biológicos, bioquímicos, físicos e químicos. Eles devem ser vencidos para se ter o efeito esperado. Uma parte em cada dez mil de um fármaco, de uso injetável, no modo intravenoso consegue alcançar seu alvo celular, quando este se encontra em sítios mais profundos (Geraldo et al. 2013).

A nanotecnologia tem produtos e protocolos aplicados em diversas áreas como: Saúde, odontológica, farmacológica e biomédica, essa nova tecnologia é capaz transportar a droga até o órgão ou célula doente, administrando-a de forma gradual e controlada. Isso representa um avanço em relação ao tratamento convencional (Herrera et al. 2017).

A evolução em tecnologia no desenvolvimento de métodos e produtos tecnológicos permitem o uso de novas técnicas para a obtenção de sistemas de liberação de fármacos. São

capazes de regular a taxa de liberação dos fármacos, promover a duração sustentada da ação terapêutica, e/ou a vetorização em um tecido específico (Nandita e Sudip 2003).

Os sistemas de liberação modificada constituem mecanismos que não são retardados ou prolongados, é uma alternativa para regular a duração do efeito de agentes terapêuticos (Qiu et al. 2013). Na liberação controlada, o fármaco é combinado com excipientes capazes de modular a liberação, sendo os polímeros os mais utilizados na produção desses sistemas (Hara et al. 2013; Guimarães et al. 2013a).

Na farmacopeia brasileira se define forma farmacêutica de liberação prolongada como aquela que permite a redução na frequência de administração (ANVISA 2010).

Devido à sua natureza hidrofílica, o polietilenoglicol (PEG) tem sido de grande interesse para a entrega de vários compostos bioativos com valor terapêutico (Elvassore et al. 2001; Chen et al. 2011). A adição de fármacos na superfície das partículas de (PEG) podem permitir sua estabilização no trato gastrointestinal (TGI) devido à inibição de adsorção de proteínas do plasma, e pode melhorar o transporte de drogas através do epitélio intestinal (Calceti et al. 1990; Chen et al. 2011).

Nos últimos anos houve uma grande inovação tecnológica na área de desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos (Fuertes e Abuchowski 1990), propuseram uma terapia chamada de PEGlação, em que há um acoplamento covalente de polietilenoglicol (PEG) às cadeias de drogas, que por sua vez, aumenta o raio hidrodinâmico de uma formulação biofarmacêutica e protege a sua superfície em direção à periferia (Ruan e Feng 2003). Assim, a estabilidade destes conjugados em relação a enzimas (*proteases*) é aumentada, sua imunogenicidade é reduzida e sua excreção renal é desacelerada (Chen et al. 2011).

Sistemas de liberação só são possíveis por meio de vetores que permitam este controle. Dentre os vetores que apresentam esta função, destacam-se as partículas, estas podem ser de dois tipos: esferas ou cápsulas (Ruan e Feng 2003). Nas cápsulas, o núcleo é composto pela substância ativa, apresenta ao seu redor um invólucro da matriz utilizada na encapsulação. Por outro lado, nas esferas o princípio ativo encontra-se disperso, seja por retenção ou adsorção à matriz (Abdelwahed et al. 2003).

PEG é candidato a formulação de nanopartículas carreadoras de drogas, aminoácidos e proteínas (Dorati et al. 2007). Estas partículas têm a capacidade de não serem reconhecidas pelo sistema imunológico e podem circular por períodos de tempo longos no organismo, aumentando sua vida útil e eficiência terapêutica (Ruan e Feng 2003; Dorati et al. 2007). Estas partículas poliméricas possuem a capacidade de adsorção a compostos orgânicos, modificando ou melhorando funções biológicas (Scott et al. 2010).

O (PEG) tem sido amplamente aplicado nas áreas biomédicas como carreadores por não ser tóxico, ser solúvel em água e apresentar atividade anticoagulante (Chen et al. 2011). Outro fator importante a ser considerado, é o fato de que o Polietilenoglicol foi aprovado para consumo humano em aditivos alimentares pela ANVISA (portaria nº 912/MS/SVS - D.O.U. 18/11/98).

Considerando o papel distinto em relação às linhagens celulares, a glicina atua em processos inflamatórios. As características do PEG como um importante sistema de liberação de componentes bioativos, é possível prospectar que a adsorção deste aminoácido às nanopartículas de PEG possa modular as funções de células do sistema imunológico, e melhorar os processos terapêuticos, potencializando interações entre os fatores

imunomoduladores celulares na atividade anti-inflamatórias, na presença de glicina adsorvida em sistemas poliméricos como nanopartículas de PEG.

CAPÍTULO 4

MATERIAL e MÉTODOS

Este capítulo descreve o processo de síntese do complexo Gly@PEG/NPs e sua suspensão em meio aquoso, bem como as técnicas e condições empregadas na caracterização das amostras e nos ensaios biológicos.

4.1 Síntese e Preparações das Nanopartículas de PEG (PEG/NPs)

As nanopartículas de PEG (PEG/NPs) foram obtidas a partir de Polietilenoglicol 6000, (Polietileno glicol 6000 Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) pH= 6.8 usando uma modificação do método descrito (Scott et al. 2010; Fagundes et al. 2012; Hara et al. 2013; Guimarães et al. 2013a). A síntese foi realizada no laboratório de química da UnB, no Instituto de física.

O PEG 6000 (10 g) foi diluído em 100 mL de tampão fosfato salino (PBS) (0.016 molL^{-1}) e incubado por 45 min a 45°C em banho-maria. Em seguida foi preparada uma solução de sulfato de sódio a 2% em PBS e adicionado por gotejamento $100\mu\text{L}$. Após a incubação, as soluções de PEG foram diluídas 3:1 em PBS sob rigorosa agitação adicionando $100\mu\text{L}$ de sulfato de sódio (UltraTurrax IKA T25/Sonda de Ultrassom 10 minutos). Em seguida foi realizado tratamento térmico por 30 minutos a 45°C (banho maria) para favorecer a triagem em tamanho. Posteriormente o preparado foi centrifugado por 15 minutos a 15.000 rpm e lavado (2x); Diluído 10 vezes o (PEG+ sulfato de sódio $100\mu\text{L}$ 0,45 mM) em PBS para

induzir termicamente a formação de nanopartículas por 7 minutos à 97°C em banho-maria. Posteriormente, a solução de glicina (Dinâmica[®]Química Contemporânea Ltda), pH= 5,1 foi ajustado para 6,4 e incubado volume a volume, na concentração de 10^{-3} molL⁻¹ junto à nanopartículas de PEG a 37°C por 30 minutos.

A fim de investigar o efeito do teor de Gly no complexo Gly@PEG/NPs, foram preparadas três soluções de Gly em PBS nas seguintes concentrações: 0,001, 0,1 e 1,0 molL⁻¹. Sob agitação a 37°C por 30 minutos, as soluções de Gly foram adicionadas na suspensão coloidal de PEG/NPs como preparada (volume-a-volume). As amostras resultantes foram nomeadas xGly@PEG/ NP, com x = 1, 2 e 3 significando Gly em PBS a 0,001, 0,1 e 1,0 mol/L, respectivamente. Para investigar a reprodutibilidade do protocolo de síntese e a estabilidade dos PEG/NPs, a síntese foi repetida 20 vezes e os resultados foram analisados quanto ao diâmetro hidrodinâmico e carga superficial por meio do espalhamento dinâmico de luz (D_{DLS}) e potencial Zeta (ζ).

4.1.1 Caracterização física dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs

O diâmetro hidrodinâmico (D_{DLS}) e o potencial zeta (ζ) dos complexos xGly@PEG/PEG foi avaliado em suspensão coloidal, usando um sistema Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK). O estudo da morfologia do sistema PEG/NPs foi avaliado usando microscopia óptica de alta resolução por microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (JEOL, modelo JSM-6610) a temperatura ambiente.

4.1.2 Caracterização dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs quanto às suas propriedades físico-químicas.

- Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização físico-química dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs e da Gly pura foram realizados por meio da técnica de espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectro de FTIR modelo Vertex 70 (Bruker). Amostras foram maceradas com KBr seco e limpo, originando pastilhas de KBr. Os espectros de infravermelho, foram obtidos na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 2 cm^{-1} , via análise média de 32 scans.

- Espectroscopia Raman normal e Espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS)

O coloide de prata usado nos experimentos SERS foi preparado segundo a literatura reduzindo AgNO_3 com excesso de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Lee e Meisel 1982). Em suma, o AgNO_3 foi dissolvido em água destilada ($0,1 \text{ mg/mL}$). Em seguida, uma solução aquosa de citrato de sódio (10 mg/mL) foi adicionada sob vigorosa agitação. A solução foi mantida sob ebulição por 15 min e resfriada pela adição da água destilada. Este protocolo leva a coloides de prata estáveis por várias semanas quando são mantidas à temperatura ambiente. Para estudos SERS, $25 \mu\text{L}$ da amostra xGly@PEG/NPs foi diluída em alíquotas de $25 \mu\text{L}$ coloide de prata.

Espectros Raman foram imediatamente gravados. Para comparação, 25 μL do xGly@PEG/NPs. A amostra de NPs foi diluída em 25 μL de água destilada para serem medidas e Espectros SERS foram obtidos. Para investigar o efeito da interação entre as nanopartículas de prata e a molécula de Gly livre (não adsorvida em NP/PEG) foi preparada uma solução 0,1 mol/L de Gly livre em água destilada. Então, 25 μL da solução de Gly livre foi diluída em 25 μL de coloide de prata e espectros SERS foram obtidos. Adicionalmente, 25 μL de solução Gly livre foram diluídos em 25 μL de água destilada para medições de espectros de Raman normal. O laser foi focado nas amostras usando um microscópio OLYMPYS com uma objetiva 50 X (Objetiva N.A 0.75). A luz espalhada era coletada na configuração de retroespalhamento e analisados em um espectrômetro triplo (Jobin Yvon Modelo T64000) equipado com um detector CCD. Foi utilizado um laser de argônio na linha de 532 nm para iluminar a amostra com uma potência óptica de 20 mW.

4.2 - Ensaios Biológicos

4.2.2 Cultura de células

4.2.2a Obtenção de células da linhagem RAW 264.7 (Macrófagos)

A linhagem celular utilizada foi de camundongo RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), ATCC® Number: TIB-71™, Organism: *Mus musculus*, mouse. Tissue: Abelson Murine Leukemia Virus-Induced Tumor; Ascites Cell Type: Macrophage Disease: Abelson Murine Leukemia Virus-Induced Tumor. Product Format: frozen. As células são crescidas em

garrafas de poliestireno T75, com meio de cultura DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (PEN/STREP). O meio de cultura da garrafa foi trocada a cada 24 horas (adicionar 10 mL de meio suplementado). Até a cultura atingir 80% de confluência, descartou-se o meio e adicionou-se 3 mL de meio suplementado. As células foram retiradas da garrafa com a ajuda de um *scraper* e determinado o número de células e a viabilidade celular utilizando câmara de Neubauer e solução de azul de tripan.

4.2.2b Obtenção de amostras (Macrófagos do colostro humano)

Amostras contendo 15 ml de colostro foram coletados de mulheres clinicamente saudáveis com idades entre 18 e 30 anos, todas cadastradas no sistema de saúde de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil, mediante autorização e consentimento por escrito, totalizando um sujeito amostral de $N = 18$. Todas as mães tinham dado à luz a neonatos saudáveis. Amostras de colostro foram coletadas em tubos de plástico estéril entre 48 e 72 horas pós-parto. Todos os procedimentos foram submetidos ao comitê de ética para avaliação e receberam aprovação, autorização do comitê de ética em anexo.

4.2.2c Separação das Células (macrófagos) do Colostro humano

Após a coleta em tubos de plástico estéreis de cada doadora, as amostras foram centrifugadas a $(160 \times g, 4^{\circ}C)$ por 10 minutos, onde separou-se o colostro em três fases distintas: uma lâmina celular, uma fase aquosa intermédia e um sobrenadante contendo gordura (descartado), tal como descrito por (Honório- França et al. 1997). As células foram

separadas por um gradiente de concentração, Ficoll-Paque (Pharmacia, Upsala, Suécia), produzindo preparações com 48% de células mononucleares puras analisadas por microscopia óptica e citometria de fluxo. Os macrófagos purificados foram ressuspensos em solução de PBS isento de soro a uma concentração final de 2×10^6 células L^{-1} .

4.2.3 Análise *in vitro* da citotoxicidade dos complexos Gly, PEG/NPs e Gly@PEG/NPs

Para determinar a viabilidade celular após 24 h de incubação com Gly ($0,001 - 1 \text{ molL}^{-1}$), PEG/NPs ($0,016 \text{ mmol/L}$) e xGly@PEG/NPs ($x = 0,001 - 1 \text{ mol/L}$), foi utilizado o método de avaliação colorimétrica de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrita por (Mosmann et al. 1983). Resumidamente, Células em placa de 96 poços (2×10^4 células/poço) foram semeadas durante 24 h, a 37°C , em 5% CO_2 e 80% de umidade. Após 24 h de tratamento, o meio foi retirado e 150 mL de solução de MTT ($0,5 \text{ mg/mL}$ em meio DMEM suplementado). A solução contendo MTT foi removida após duas horas. Adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de DMSO ao meio celular e mediu-se a densidade óptica de cada poço utilizando-se a linha 595 nm com um espectrofotômetro conjugado com um leitor de microplacas (Bio-rad, Hercules-CA, EUA).

4.2.4 Obtenção da Espécie *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi isolada das fezes de uma criança com diarreia (sorotipo 0111:H⁻, LA⁺, eae⁺, EAF⁺, bfp⁺). Este material foi preparado e ajustado para 10^7 bactéria mL^{-1} , como descrito por (Honorio-França et al. 1997).

4.2.5 Estudos de Imunomodulação e quantificação de citocinas expressas por macrófagos do colostro humano quando tratadas com Gly pura e com os complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs

Para os ensaios biológicos com os imunomoduladores foram utilizadas linhagens celulares marcadas com CD-14, marcador de fluorescência. A linhagem foi cultivada de acordo com (França et al. 2016). Resumidamente: a modulação dos fagócitos do colostro por glicina, nanopartículas de polietilenoglicol e Gly@PEG/NPs. Os fagócitos (2×10^6 cels/ml) serão incubados por uma hora a 37°C. Em seguida foram realizados os ensaios de viabilidade celular, liberação do ânion superóxido, de liberação de cálcio intracelular e fagocitose e atividade microbicida.

As avaliações foram realizadas no Citômetro de Fluxo (FACSCalibur) equipado com o laser de íon argônio (488nm), detectores de dispersão para tamanho (FSC – forward scatter) e complexidade interna (SSC – side scatter) e detectores de emissão de fluorescência FL1 (515-545 nm), FL2 (564-606 nm) e FL3 (670 nm).

Quantificação das Citocinas: As concentrações de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL – 8, IL-10, IL – 12, IL - 17 TNF, IFN- γ e IL-1 β) foram avaliadas pelo Kit “Cytometric Bead Array” (CBA, BD Bioscience, USA). As análises destas citocinas serão realizadas através de citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados através do software FCAP Array (BD Bioscience, USA). O Kit BD Cytometric Bead Array (CBA) que permite em um único teste a determinação simultânea de várias citocinas em uma mesma amostra usado nesse estudo para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL – 8, IL-10,

IL – 12, IL - 17 TNF, IFN- γ e IL-1 β . Foram utilizados 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de beads e 50 μ L do reagente de detecção PE – Phico eritrina (E1)- Detector do controle positivo e FITC (E2)– Detector do controle positivo. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

4.2.6 Avaliação da fagocitose e atividade microbicida de macrófagos do colostro humano quando tratadas com os Gly pura e com os complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs

Para avaliar a atividade fagocitária e microbicida dos macrófagos do colostro humano foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* (EPEC), isolada das fezes de uma criança com diarreia (sorotipo 0111: H-, LA*, eae*, EAF*, bfp*). Este material foi preparado e ajustado na concentração de 10^7 bactérias/ml, como descrito por (Honorio-França et al.1997). O percentual de fagocitose foi determinado pelo exame microscópico das células coradas com acridina laranja.

A fagocitose e a atividade microbicida serão avaliadas pelo método de alaranjado de acridina (Bellinati-Pires et al. 1989). Volumes iguais de bactérias e de suspensões de células serão misturadas e incubadas a 37 °C durante 30 min sob agitação contínua. Fagocitose será interrompida por controle de temperatura com auxílio de incubação em gelo. Para eliminar as bactérias extracelulares, as suspensões serão centrifugadas duas vezes (160 x g, 10 min, 4 °C). As células foram ressuspensas em meio isento de soro 199 e centrifugadas. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento tingido com 200 μ L de alaranjado de acridina (Sigma, St. Louis, EUA; 14,4 g L⁻¹), rigorosamente durante 1 min. O sedimento foi ressuspendido em meio 199 a frio, após a lavagem por duas vezes deverão ser observados no microscópio de

imunofluorescência com ampliação de 400x e 1000x. O índice de fagocitose foi calculado através da contagem do número de células de pelo menos 1000 células, ingerindo bactérias em uma associação de 100 células. Para determinar o índice bactericida, as lâminas foram coradas com laranja de acridina e contadas, por meio de células mortas, vivas e em atividade fagocítica por macrófagos. O índice bactericida foi calculado como a razão de coloração (laranja –morta; verde- vivo) x 100 bactérias (França et al. 2011a). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3 Análise estatística

As análises estatísticas da Viabilidade Celular, Fagocitose, Atividade Microbicida, e produção de Citocinas foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) calculando a estatística F. Em seguida por comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni. As estatísticas foram consideradas significativas quando o “p valor” foi menor que 0,05 ($p < 0,05$) (Cuevas et al. 2004).

Capítulo 5 – Resultados e discussão

5.1 - Caracterização Físico-química e morfológica do complexo Gly@PEG/NP (Guimarães et al. 2018a)

Neste estudo, a análise do complexo Gly@PEG/NP, foi realizado por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Potencial Zeta, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica Transmissão (MET), Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Espectroscopia Raman Normal, Espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS). Os estudos e ensaios biológicos foram avaliados a viabilidade celular pelo método de MTT para as células RAW e macrófagos do colostro humano. Para os estudos da fagocitose em macrófagos do colostro humano foi utilizado o método e alaranjado de Acridina. A avaliação da produção de citocinas foram realizados nos ensaios de Imunomodulação por citometria de fluxo. Neste estudo verificou-se a síntese de estruturas nanoparticuladas de polietilenoglicol 6000 (PEG) de tamanho aproximado de 100 nm, que se constitui no ineditismo de parte do trabalho, e que foi capaz de promover a adsorção de nanopartículas de PEG a glicina. Foi possível observar também a caracterização química, física e a capacidade imunomoduladora deste material funcional sobre as linhagens celulares macrófagos.

5.1.1 - Caracterização morfológica dos complexos Gly@PEG/NPs por MEV e MET

A Fig. 5.1 mostra as micrografias típicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET) das amostras Gly@PEG/NPs. Verificou-se que tanto o complexo Gly@PEG/NPs quanto o PEG/NPs possuem morfologia similar. As imagens de MEV da suspensão coloidal seca da amostra de 2Gly@PEG/NPs (ver Fig. 5.1 (a)) mostram a formação de estruturas parcialmente organizadas, provavelmente construídas por interação elétrica dipolo-dipolo resultante da carga superficial das nanopartículas de PEG. Além disso, as imagens MEV também mostram que as nanopartículas de PEG têm formas não esféricas, que provavelmente se originaram da fusão de duas ou mais NPs, durante o processo de secagem. O histograma de tamanho de partícula, como mostrado na Fig. 5.1 (b), revela NPs com um diâmetro médio de $D_{TEM} = 54,3$ nm e índice de polidispersão de $\sigma_{MET} = 0,16$. O diâmetro das nanopartículas (D_{MET}) foi determinado levando-se em conta o comprimento do segmento unindo as duas extremidades da nanopartícula e passando pelo centro de massa. As medições de DLS permitiram avaliar tanto o diâmetro hidrodinâmico quanto o potencial zeta das PEG/NPs. Foi encontrado um diâmetro hidrodinâmico (D_{DLS}) e um potencial zeta (ξ) 324 ± 30 nm e $-1,2 \pm 0,2$ mV, respectivamente. Além disso, apesar de mostrar um diâmetro hidrodinâmico semelhante, $\sim 320 \pm 35$ nm, as amostras de Gly@PEG/NPs, com $x = 1, 2$ e 3 revelaram ξ com valores de $-1,3 \pm 0,2$, $-10,3 \pm 0,2$ e $-13,5 \pm 0,2$ mV, respectivamente. Os valores de D_{DLS} avaliados são maiores que o valor de D_{MET} devido à solvatação das nanopartículas em meio aquoso via ligação de hidrogênio entre moléculas de água do meio e os terminais moleculares presentes na superfície das nanopartículas de PEG. Os dados mostraram que o potencial zeta da amostra de PEG/NPs, em torno de $-1,2$ mV, foi aumentado para $-10,3$ mV e

-13,5 mV, para amostras de PEG/NPs adsorvidas com 0,1 e 1,0 molL⁻¹, respectivamente. O aumento negativo das cargas não somente revela que as PEG/NPs foram carregadas com sucesso, mas também suporta hipótese de que os grupos carboxil (COO⁻) e da Gly-adsorvida nas PEG/NPs estão virados para o exterior em direção ao meio aquoso.

A micrografia MET da amostra de 2Gly@PEG/NPs (Fig. 5.1(c)) mostra aglomerados de PEG/NPs os quais estão heterogeneamente dispersos. A presença de aglomerados é provavelmente uma consequência da preparação da amostra durante o processo de secagem. Imagens de seções ultrafinas obtidas por HRTEM são mostradas na Fig 5.1 (d–f). Essas imagens demonstram a coexistência de fases amorfas e cristalinas, que são comumente observadas em muitas redes de polímeros interpenetrantes (IPNs) (Bai et al. 2006; Passos et al. 2016). A Fig. 5.1 (f) mostra alguns poros circulares irregulares com cascas cristalizadas formadas por seis a doze camadas treliçadas. As camadas se entrelaçam, interpenetram ou se fundem ao longo de bordas adjacentes. A Fig. 5.1 (g) exhibe um padrão de difração de cristal típico, confirmando que as PEG/NPs são compostas que possuem regiões amorfas e cristalinas.

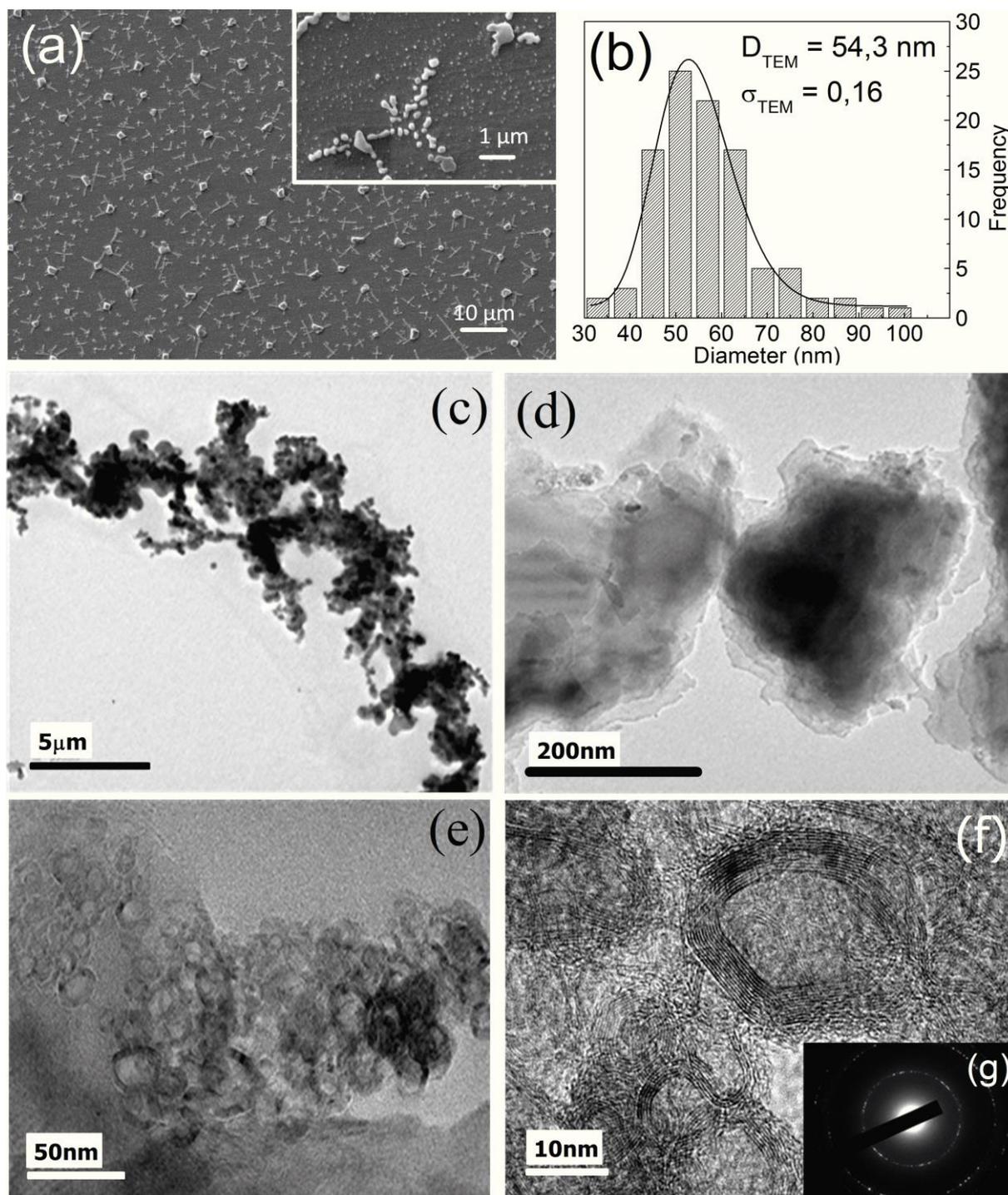


Figura 5.1. (a) imagem SEM e (b) histograma de tamanho de partícula da amostra 2Gly@PEG/NPs. (c) e (d) imagens TEM e (e) e (f) imagens HRTEM da amostra 2Gly@PEG/NPs. g) Fotografia de difração HRTEM de Gly@PEG/NPs

5.1.2 – Estudo da Estabilidade dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs por DLS

Com o objetivo de avaliar a estabilidade estrutural dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico foram realizadas em diferentes tempos pós-preparação das amostras ($t = 0, 15, 30, 45$ e 60 dias). Os resultados desses experimentos são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs em função do tempo de pós-preparação.

Amostras	0		15(dias)		30(dias)		45(dias)		60(dias)	
	D_h /nm	ζ /mV								
PEG/NPs	191±11	-1.2	197±11	-3,7	324±30	-1.2	349±22	-1,3	549±34	-1.9
1Gly@PEG/NPs	209±12	-1.6	214±14	-2,9	320±35	-1,3	355±28	-1,9	557±32	-1.4
2Gly@PEG/NPs	213±14	-11,9	218±16	-14,7	340±44	-10,3	371±47	-10,1	571±37	-8,9
3Gly@PEG/NPs	229±14	-9,5	234±16	-11,4	356±24	-13,5	391±25	-9,2	599±45	-9,7

Como pode ser verificado na Tabela 5.1, verifica-se que enquanto o potencial zeta se mantém praticamente constante o diâmetro hidrodinâmico cresce com aumento do tempo de pós-preparação.

5.1.3 Propriedades ópticas dos complexos PEG/NPs e Gly@PEG/NPs

A Fig 5.2(a) mostra os espectros de FTIR dos complexos PEG/NPs (i) e 2Gly@PEG/NPs (ii), e para comparação o espectro da Gly livre é mostrado em (iii). O espectro de FTIR do complexo PEG/NPs (Fig, 5.2(a - i) mostra bandas largas em torno de

1640 e 3440 cm^{-1} , respectivamente associados aos modos *bending* e *stretching* do grupo hidroxila OH. Na Fig. 5.2 (a – i) as bandas em torno de 2880, 1465/1342 e 1242 cm^{-1} são devidos, respectivamente, aos modos vibracionais *stretching*, *bending* e *twisting* do metileno C-H (Catauro et al. 2014). As bandas em torno de 950 e 1110 cm^{-1} estão associados aos modos *stretching* das ligações C – C e C – O, respectivamente. Finalmente, as bandas em torno de 533 e 860 cm^{-1} correspondem às vibrações do esqueleto da molécula de PEG.

Comparando os espectros de FTIR das amostras PEG/NPs, 2Gly@PEG/NPs e Gly livre (Fig. 5.2 (a)), verifica-se que a maior parte dos modos vibracionais estão associados com Gly zwitterionica (Rosado et al. 1998). Evidências dos modos de vibração da molécula PEG somente são encontrados em torno de 1110 cm^{-1} devido a ligação (C-O) e 1342 e 1465 cm^{-1} , os dois últimos associados com modo *bending* do metileno C – H. Em relação aos modos vibracionais da Gly, após o carregamento no PEG, foram encontradas bandas relacionadas a vibrações dos átomos ligados ao esqueleto em 505 e 893 cm^{-1} , atribuídos respectivamente aos modos $t(\text{CCO})$ e $\nu(\text{C-C})$, bem como aos modos *stretching* simétrico do carboxilato $\nu_s(\text{COO}^-)$ em torno de 1412 cm^{-1} , esse último aproximadamente inalterado (ver Fig. 5.2(b) – banda enfatizada em preto). Por outro lado, foi verificado que após a adsorção em PEG os modos vibracionais assimétrica da Gly $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ e das $\delta_{as}(\text{NH}_3^+)$ - enfatizados em preto e cinza em Fig. 5.2(b)), são deslocados para maiores energias em 21 e 24 cm^{-1} , respectivamente. Diferentemente, o modo *bending* simétrico Gly atribuído ao grupo amino $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ está deslocado para menores energias com sua intensidade relativa intensamente reduzida. Esses resultados sugerem que as moléculas de Gly estão interagindo com as cadeias poliméricas do PEG, principalmente por meio dos grupos amino.

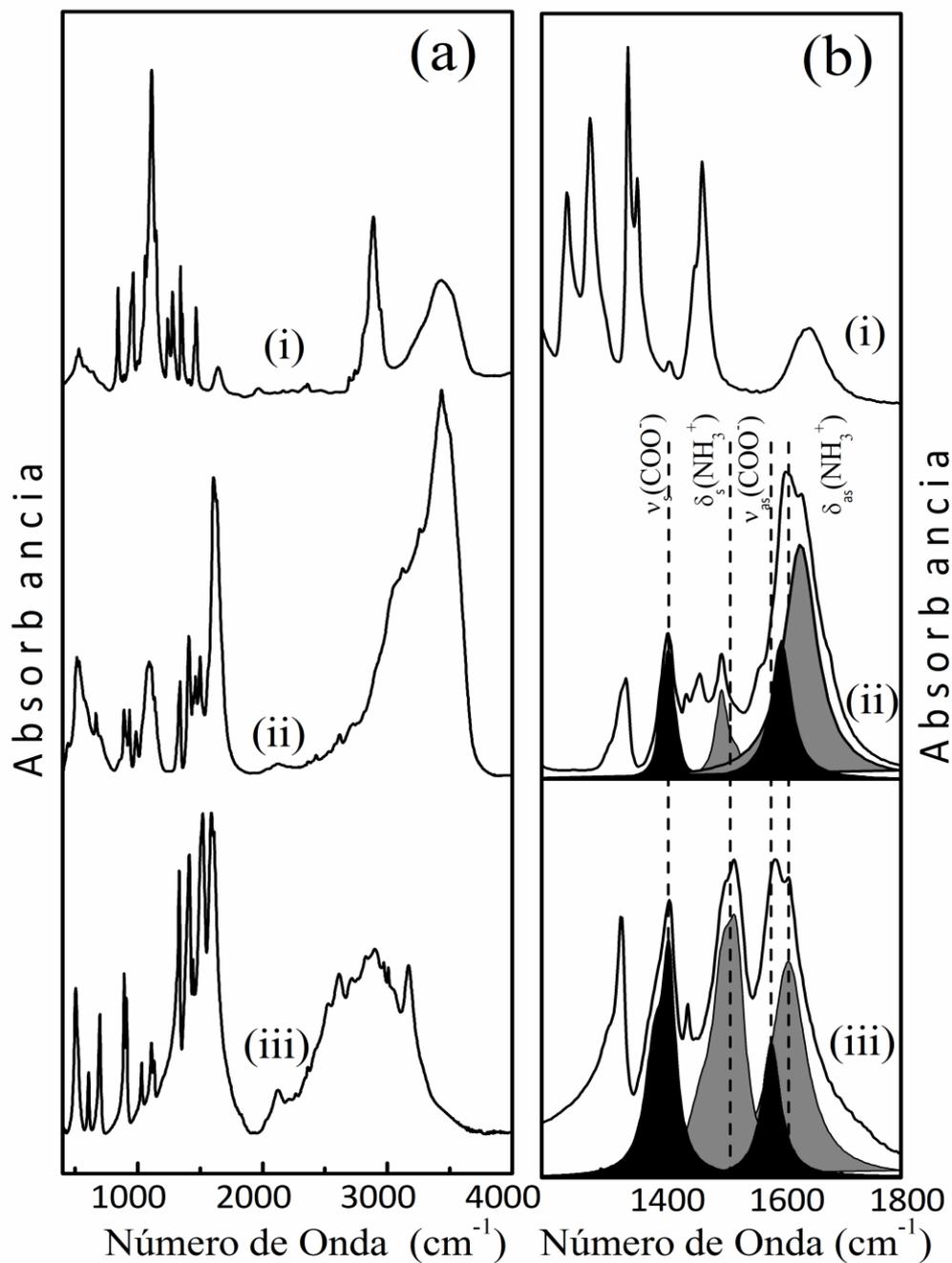


Fig. 5.2 (a) Espectros de FTIR dos complexos: (i) PEG/NPs, (ii) 2Gly@PEG/NPs, e (iii) Gly livre. (b) ampliação dos espectros de FTIR (painel esquerdo) na região de 1200–1800 cm^{-1} , as estruturas em preto e cinza representam os modos vibracionais do grupo COO^- e NH_3^+ respectivamente.

Para estudar o efeito da interação entre a molécula de Gly e o complexo PEG/NPs espectros de Raman Normal (Fig. 5.3) e SERS (Fig. 5.7) foram obtidos. O espectro Raman

normal do complexo PEG/NPs é apresentado na Fig. 5.3(a-i), no qual os modos *bending* da ligação C – C – O são encontrados em torno de 365 e 501 cm^{-1} (Léon et al. 2017). As vibrações de deformação do esqueleto das moléculas de Gly podem ser encontradas em torno de 894 e 922 cm^{-1} , enquanto às vibrações *stretching* da ligação C – O estão em torno de 1046 cm^{-1} (Yamini et al. 2014).

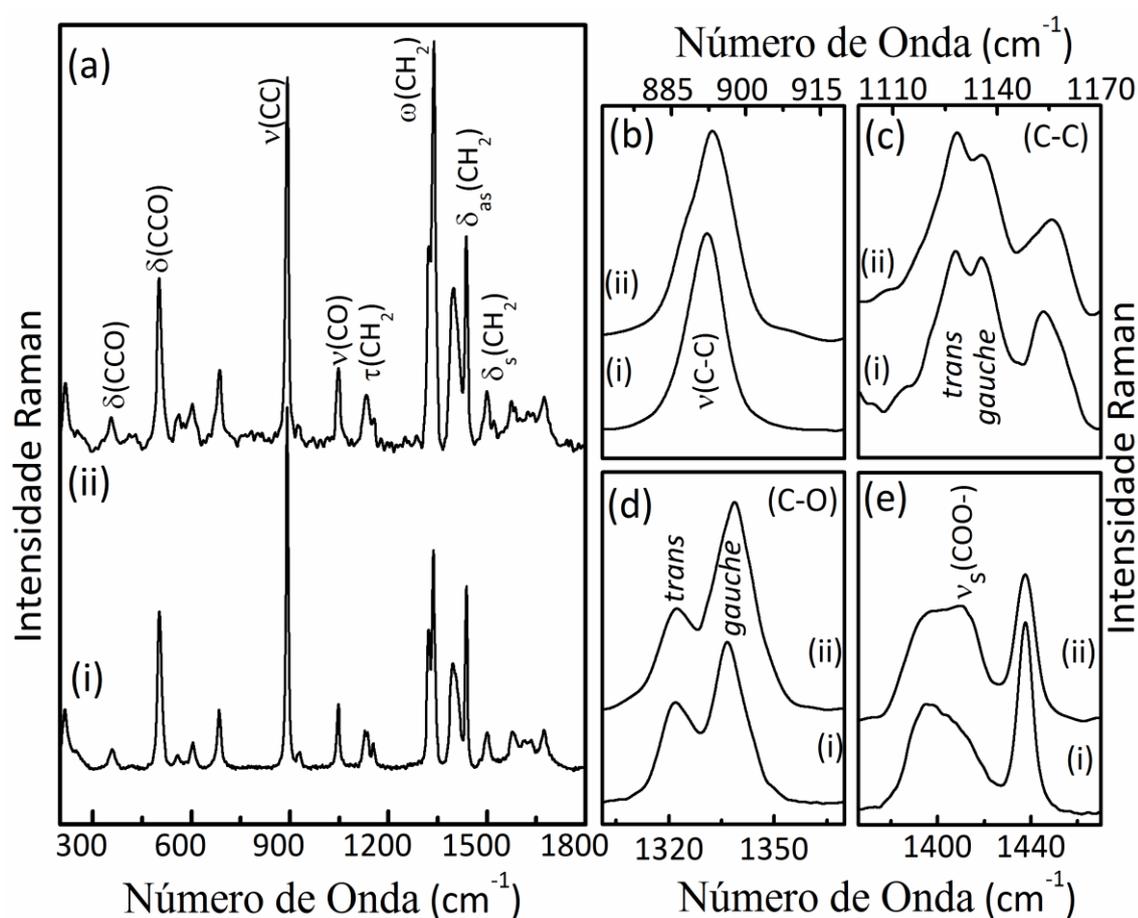


Figura. 5.3. (a) Espectro do Raman normal dos complexos: (i) PEG/NPs e (ii) 2Gly@PEG/NPs. Ampliação em diferentes regiões espectrais dos espectros do Raman normal do complexo 2Gly@PEG/NPs ((b) - (c)) e do complexo PEG/NPs (d - e).

Finalmente, as bandas observadas na faixa de 1200–1500 cm^{-1} estão associadas aos modos vibracionais do grupo CH_2 ($\text{t}(\text{CH}_2)$) em (1110–1150) cm^{-1} ; $\omega(\text{CH}_2)$ em (1310–1350) cm^{-1} e *bending* simétrico e antissimétrico das ligações ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) (1350-1500) cm^{-1} (Matsuura e Fukuhara 1986). Uma compilação dos modos Raman do complexo PEG/NPs é dada na Tabela 5.2

Tabela 5.2: Posição dos modos vibracionais obtidos do Raman normal e SERS para PEG/NPs, Gly (0.1 mol/L), Gly@PEG/NPs.

Normal Raman (cm ⁻¹)			SERS (cm ⁻¹)		Assignment
PEG/NPs	Gly Solution	Gly@PEG/NPs	Gly Solution	Gly@PEG/NPs	
			335		$\delta(\text{CCN})$
365					$\delta(\text{C-C-O})$
501					$\delta(\text{C-C-O})$
	505		505	505	$\rho(\text{COO}^-)$
	585		585	585	$\omega(\text{COO}^-)$
			612		$\rho(\text{NH}_3^+)$
	670			670	$\delta(\text{COO}^-)$
			773		$\rho(\text{NH}_3^+)$
	897	892	897	897	$\nu(\text{C-C})$
894					Skel def
922					Skel def
	1030			1030	$\nu(\text{C-N})$
1046					$\nu(\text{C-O})$
	1103				$\rho(\text{NH}_3^+)$
	1115		1126	1115	$t(\text{NH}_3^+)$
1126					$t(\text{CH}_2)$ (G)
1136					$t(\text{CH}_2)$ (T)
			1190		$\nu(\text{C-N})$
			1270		Amide III
1320					$\omega(\text{CH}_2)$ (T)
	1330		1330	1330	$\omega(\text{CH}_2)$
1340					$\omega(\text{CH}_2)$ (G)
			1360		$\omega(\text{CH}_2)$
					$\omega(\text{CH}_2)$
	1412	1410	1410	1410	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1438					$\delta_{as}\text{CH}_2$
	1445		1445	1445	$\delta(\text{CH}_2)$
1500					$\delta_s(\text{CH}_2)$
	1520		1507	1513	$\delta_s(\text{NH}_3^+)$
	1597			1551	$\delta_{as}(\text{NH}_3^+)$

G. gauche, T, trans; δ , bending; ν , stretching; ω , wagging; ρ , rocking; t, twisting; s, symmetric mode; as, asymmetric modes

Curiosamente, verificou-se que o espectro Raman normal do complexo 2Gly@PEG/NPs (Fig. 5.3 (a) - (ii)), bem como os espectros Raman dos complexos xGly@PEG/NPs (com x = 1 e 3, mostradas nas Figuras. 5.4 e 5.5), são muito semelhantes ao

espectro Raman normal do complexo PEG/NPs. No entanto, uma análise cuidadosa dos espectros Raman gerados a partir dos complexos xGly@PEG/NPs revelam a presença de pequenas alterações espectrais, provavelmente relacionadas às assinaturas da molécula de Gly interagindo com as cadeias poliméricas do PEG (ver Fig. 5.3 (b – e) e Fig 5.5).

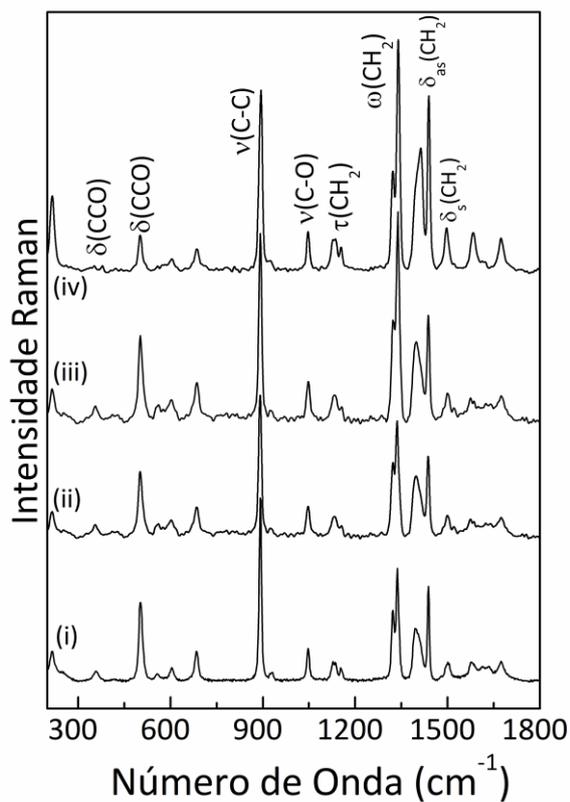


Fig. 5.4 Espectros Raman normal dos complexos (i) PEG/NPs e xGly@PEG/NPs com (ii) $x = 1$, (iii) $x = 2$, e (iv) $x = 3$.

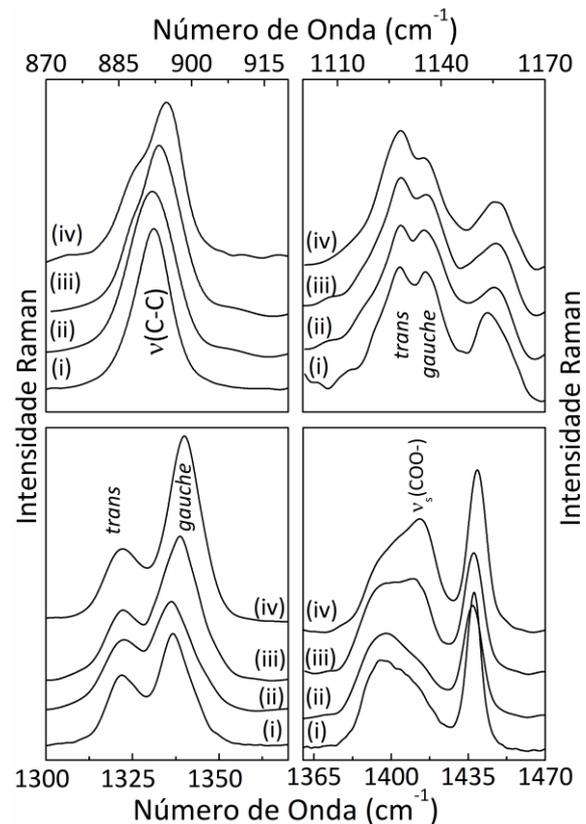


Fig. 5.5 Ampliações, em diferentes regiões espectrais dos espectros Raman normal dos complexos (i) PEG/NPs e xGly@PEG/NPs com (ii) $x = 1$, (iii) $x = 2$, e (iv) $x = 3$.

Como sugerido pelas imagens de MEV e MET, as nanopartículas de PEG foram preparados por meio do dobramento das longas cadeias poliméricas do PEG. Nessas cadeias, os átomos assumem posições espaciais estáveis, caracterizadas pelos comprimentos da

ligação interatômica e pelos ângulos das ligações. Estudos anteriores sugerem que a estrutura ordenada é semelhante à hélice encontrada no estado sólido, assumindo a conformação *trans-gauche-trans* em torno de sucessivas ligações de O–C–C–O com desordem parcial da cadeia polimérica causada pela conformação *gauche* em torno da ligação C–C e conformação *trans* em torno das ligações C–O (Takahashi e Tadokoro 1973). Assim, diferentes conformações das ligações C–C e C–O da cadeia polimérica do PEG, sugerem a presença de diferentes tipos de ligações de hidrogênio. Conseqüentemente, é esperado observar mudanças nas intensidades integradas dos modos Raman associados com as vibrações *wagging* e *twisting* do grupo CH₂ (Begum e Matsuura 1997; Kozielski 2006). Além do mais, mudanças na taxa das intensidades integradas das bandas Raman associadas às conformações *gauche* e *trans* (I_g/I_t) estão correlacionadas com o número de monômeros de PEG assumindo essas duas conformações. No presente estudo, esses modos são encontrados em torno de 1340 cm⁻¹ (*gauche*) e 1320 cm⁻¹ (conformações *trans*) para ligações C–C e em torno de 1136 cm⁻¹ (*gauche*) e 1126 cm⁻¹ (conformações *trans*) para as ligações C–O.

Análises da taxa I_g/I_t para os modos Raman associados com as ligações C–C (Fig. 5.3 (c)) e C–O (Fig. 5.3 (d)) mostram que $(I_g/I_t)^{(C-C)}$ aumenta de 1,8 (PEG/NPs) para 3,0 (2Gly@PEG/NPs), enquanto $(I_g/I_t)^{(C-O)}$ diminui de 1,6 (PEG/NPs) para 1,0 (2Gly@PEG/NPs). Vale mencionar que a relação I_g/I_t permanece praticamente inalterada para o complexo 1Gly@PEG/NPs em comparação com o complexo PEG/NPs. No entanto, a taxa $(I_g/I_t)^{(C-C)}$ do complexo 3Gly@PEG/NPs (1,0 molL⁻¹) é aproximadamente três vezes maior (5,3) que o valor encontrado na amostra NP/PEG (1,8), enquanto que a taxa $(I_g/I_t)^{(C-O)}$ para o complexo 3Gly@PEG/NPs decresce em mais de um terço (0,5) (ver Fig. 5.5). Esses resultados sugerem que, quando se aumenta o teor de Gly no complexo PEG/NPs, tanto da população da

conformação tipo-*gauche* em torno das ligações C-C, quanto a população da conformação tipo-*trans*, em torno das ligações C-O, aumentam. O aumento da população de conformação tipo-*gauche* em torno da ligação C-C favorece a formação de ligações de hidrogênio na cadeia polimérica do PEG, ligando as moléculas Gly aos átomos de oxigênio da molécula PEG. Esses resultados estão de acordo com (Kozielski 2006), que relatou o estudo de alterações nas conformações em cadeias de polioxietilenoglicóis. Outras evidências da interação entre a molécula de Gly e a cadeia polimérica do PEG são mudanças na energia dos modos vibracionais do esqueleto da molécula de PEG, torno de 892 cm^{-1} (ver Fig. 5.3 (b)) e o aumento da intensidade do pico em torno de 1410 cm^{-1} , provavelmente associada ao grupo COO^- da Gly (ver Fig. 5.3 (e)). O surgimento da banda Raman em torno de 1410 cm^{-1} sugere que o grupo funcional do ácido carboxílico da molécula Gly está voltado para o meio aquoso do coloide. Esse resultado reforça a hipótese de que a molécula de Gly interage com a nanopartícula de PEG por meio dos átomos de oxigênio do PEG que se ligam às moléculas da Gly via grupo NH_2 . Uma representação esquemática de nanopartículas de PEG adsorvido com glicina é mostrada na Figura 5.6

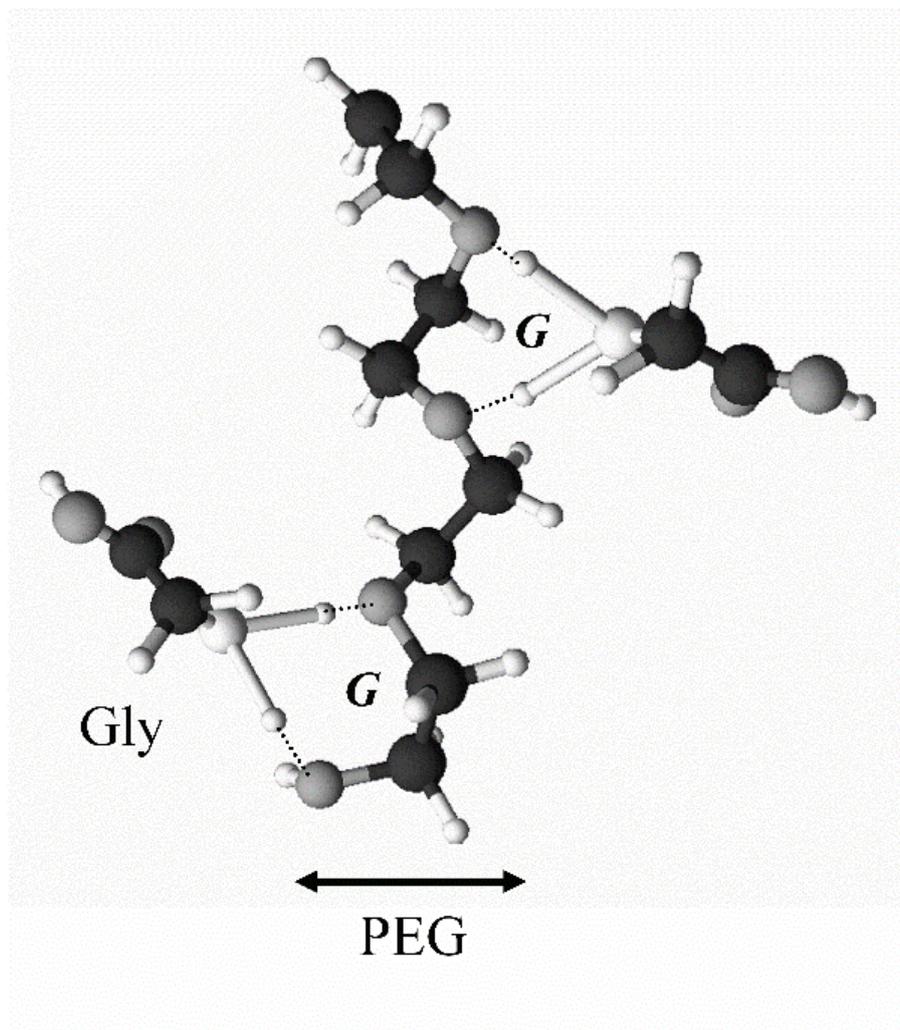


Fig. 5.6 Representação esquemática da adsorção das moléculas de Gly na cadeia polimérica do PEG.

A literatura relata vários trabalhos utilizando a técnica SERS para avaliar informações sobre a adsorção de moléculas de Gly na superfície da prata (Podstawka et al. 2004; Parameswari et al. 2016). Entretanto, considerando que a Gly em meio aquoso apresenta dois polos carregados interagentes devido à transferência de prótons, ou seja, relacionados aos grupos funcionais COO^- e NH_3^+ , esses estudos levam a diferentes conclusões sobre o mecanismo de adsorção da Gly na superfície de prata. Alguns trabalhos fornecem evidências de que a adsorção de Gly na superfície da prata ocorre via grupo carboxilato (Parameswari et

al. 2016). Outros, afirmam que a adsorção de Gly na superfície da prata ocorre por meio do grupo amino (Herne et al. 1991). Interações por meio de ambos os polos carregados, também foram relatadas (Herne et al. 1991; Podstawka et al. 2004). De fato, discussões sobre a orientação molecular quanto a interação da Gly com a superfície de prata, são ambíguas na literatura. Provavelmente, os diferentes resultados podem surgir devido às condições experimentais empregadas durante a realização dos experimentos; como o pH e força iônica da solução de Gly, somados à dependência da concentração de Gly. Portanto, esta questão está longe de ser esgotada e a discussão que se segue pretende contribuir para a compreensão dos dados SERS registrados a partir da Gly dispersa em meio aquoso.

Os espectros de SERS da solução de Gly (0,1 mol/L) (i), dos complexos 2Gly@NP/PEG (ii) e NP/PEG (iii), realizados em substrato de prata coloidal, são mostrados na Fig. 5.7 (a). As bandas vibracionais observadas nos espectros SERS e Raman normal, bem como suas atribuições podem ser encontradas na Tabela 5.1. Mais detalhes dos espectros de SERS ((i) - (iii)) e Raman normal (iv) da solução de Gly e dos complexos 2Gly@PEG/NPs e PEG/NPS são mostrados nas Figuras 5.8 e 5.9. Para apoiar a análise de todo o conjunto de dados, o espectro Raman normal da solução Gly será primeiramente discutido. O espectro Raman normal da Gly apresenta bandas características em 897, 1330 e 1445 cm^{-1} , as quais estão associadas ao modo *stretching* da ligação C–C de aos modos vibracionais *wagging* e *bending* do grupo CH_2 , respectivamente. As intensas bandas atribuídas aos modos *stretching* simétricos, *bending*, *wagging* e *bending/rocking* do grupo COO^- são observadas em 1412, 670, 585 e 505 cm^{-1} , respectivamente. Bandas relacionadas ao grupo amina são encontradas em 1030 cm^{-1} (C–N *stretching*), 1103 cm^{-1} (NH_3^+ *rocking*) e 1115 cm^{-1} (NH_3^+ *twisting*). Finalmente, os modos vibracionais atribuídos aos modos *bending* simétricos e assimétricos do

NH_3^+ são encontrados em 1520 e 1597 cm^{-1} , respectivamente. (Dou et al. 1999; Goryainov et al. 2006; Parameswari et al. 2016).

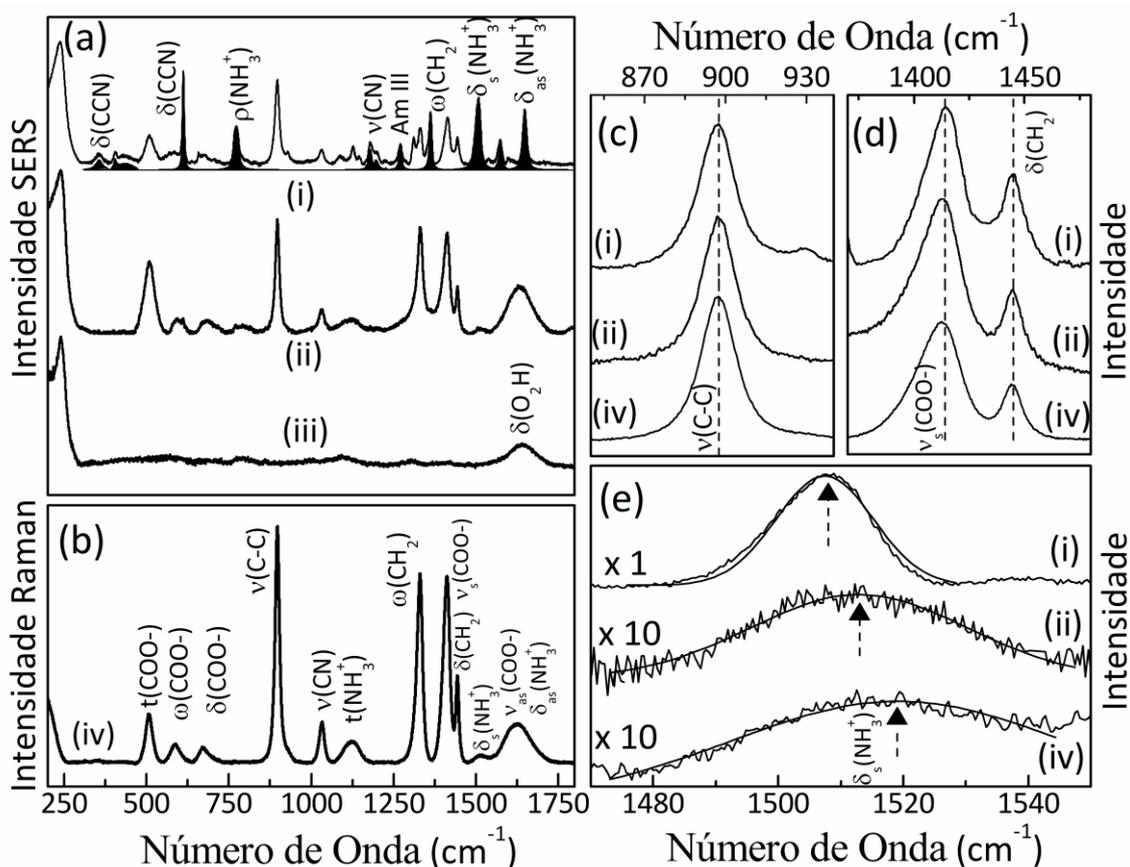


Fig. 5.7 (a) Espectros SERS: (i) solução de Gly (0,1 mol/L), (ii) 2Gly@PEG/NPs, e (iii) PEG/NPs. (b) Espectro Raman normal de solução de Gly (0,1 mol/L). Ampliações, em diferentes regiões espectrais, dos espectros SERS da solução de Gly (i) e do complexo 2Gly@PEG/NPs (ii) e, espectro Raman normal da solução de Gly (iv).

Note que, apesar de apresentarem características semelhantes, os espectros Raman normal e SERS da solução de Gly (Figura 5.6 (a - i) e 5.6 (b)) apresentam diferenças fundamentais. As semelhanças entre os espectros Raman normal e SERS da solução Gly estão relacionadas aos modos vibracionais do grupo COO^- e às ligações (C-C) e CH_2 . Foi

observado que essas bandas apresentam as mesmas energias vibracionais e aproximadamente as mesmas intensidades em ambos os espectros, Raman normal e SERS. Em ambos os casos, as bandas atribuídas ao grupo carboxilato, nomeados $\rho(\text{COO}^-)$, $\omega(\text{COO}^-)$, $\delta(\text{COO}^-)$ e $\nu_s(\text{COO}^-)$, podem ser encontradas em torno de 505, 585, 670 e 1410 cm^{-1} , respectivamente. Da mesma forma, bandas associadas ao modo *stretching* C–C e CH_2 *wagging* e *bending* são encontradas em 897, 1330 e 1445 cm^{-1} , respectivamente. Por outro lado, notáveis diferenças espectrais estão associadas a mudanças de energia e intensidades dos modos vibracionais atribuídos ao grupo NH_3^+ , nos espectros SERS em 355, 612, 773, 1190, 1270 e 1360 cm^{-1} (note bandas destacadas em preto).

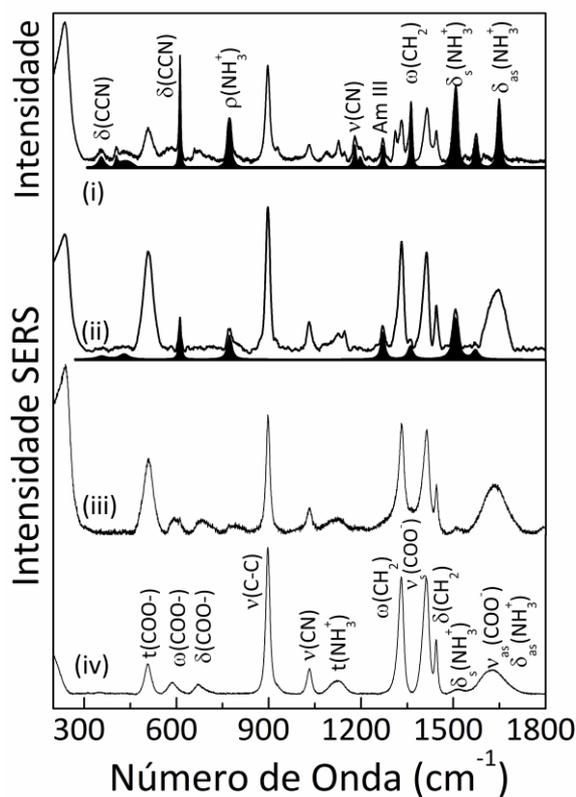


Fig. 5.8 Espectros SERS (i) e Raman normal (iv) da solução de Gly (0,1 mol/L). Espectros SERS dos complexos $x\text{Gly@PEG/NPs}$ com $x = 1,0$ mol/L (ii) e $x = 0,1$ mol/L (iii)

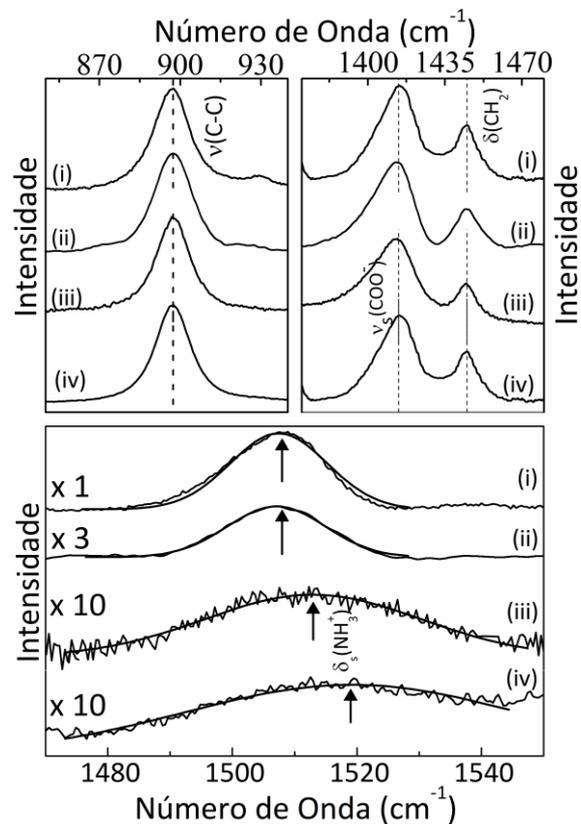


Fig. 5.9 Ampliações, em diferentes regiões espectrais, dos espectros SERS (i) e Raman normal (iv) da solução de Gly (0,1 mol/L). Espectros SERS dos complexos $x\text{Gly@PEG/NPs}$ com $x = 1,0$ mol/L (ii) e $x = 0,1$ mol/L (iii)

Na solução de Gly, são encontrados os modos vibracionais $t(\text{NH}_3^+)$ e $\delta_s(\text{NH}_3^+)$, com um picos de 1115 e 1520 cm^{-1} , no espectro Raman normal, os quais estão deslocados respectivamente para 1126 e 1507 cm^{-1} no espectro SERS. Além disso, foi verificado no espectro SERS da solução de Gly a presença de novas bandas em 355, 612, 773 e 1190 cm^{-1} , as quais de acordo com cálculos *ab initio*, estão respectivamente associadas às vibrações $\delta(\text{CCN})$, $\rho(\text{NH}_3^+)$ $\nu(\text{CN})$ (Alper et al. 1992; Parameswari et al. 2016).

Novas bandas SERS também apareceram por volta de 1270 e 1360 cm^{-1} . A origem dessas bandas ainda não é clara, provavelmente essas bandas estão associadas às vibrações de ligações amidas devido à formação do homo di-peptídeos (Gly-Gly). Nesse caso, essas novas bandas estariam associadas às vibrações das ligações de amida terciária e CH_2 , respectivamente (Podstawka et al. 2004).

Em relação ao mecanismo SERS, as vibrações moleculares ao longo da direção perpendicular à superfície ativa do SERS devem ser mais intensificadas do que às na direção paralela. Portanto, a partir dos dados da solução de Gly, pode-se inferir que a ligação C-C das moléculas de Gly está paralela à superfície da prata e que o grupo carboxilato não está adsorvido diretamente na superfície ativa (Herne et al. 1991). Sob outra perspectiva, o notável aumento da intensidade SERS no modo vibracional NH_3^+ pode estar associado com o aumento da polarizabilidade perpendicularmente à superfície da prata como consequência da proximidade do grupo NH_3^+ com a superfície. Portanto, os resultados aqui relatados fornecem uma clara evidência de que o grupo amina interage fortemente com a superfície de prata, em concordância com os dados de Raman normal

A Figura 5.7 (a) mostra os espectros de SERS dos complexos 2Gly@PEG/NPs (ii) e PEG/NPS (iii). É claro a partir dos dados SERS que o espectro do complexo PEG/NPS mostra apenas modos vibracionais relacionados ao substrato de prata (em torno de 236 cm^{-1}) e ao modo *bending* da molécula de água (em torno de 1640 cm^{-1}). Esse resultado evidencia que os modos vibracionais das moléculas de PEG não são intensificados pela superfície de prata. Além disso, diferentemente do espectro SERS para a solução de Gly, em que novos picos foram observados, o espectro SERS do complexo 2Gly@PEG/NPs (ver Fig. 5.6 (a) - (ii)) é muito semelhante ao Espectro Raman normal da solução de Gly (ver Fig. 5.6 (b)). Exceto pelo deslocamento observado para a banda relacionado ao modo vibracional $\delta(\text{NH}_3^+)$ (ver setas na Fig. 5.7 (e)), nenhum outro deslocamento ou pico adicional foi encontrado. Verificou-se que modo $\delta(\text{NH}_3^+)$ tem sua energia deslocada de 1520 para 1513 cm^{-1} ($\Delta = 7\text{ cm}^{-1}$).

É importante enfatizar que o deslocamento do modo vibracional $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ foi maior ($\Delta = 13\text{ cm}^{-1}$) para o espectro SERS da solução Gly. Esse comportamento é uma clara evidência de que a molécula Gly interage mais fortemente com a superfície de prata do que com a molécula de PEG. Na verdade, todos os modos vibracionais SERS do complexo 2Gly@PEG/NPs exibem intensidades similares às intensidades observadas no Espectro Raman, sugerindo que, enquanto adsorvido no complexo PEG/NPs, as moléculas de Gly estão orientadas aleatoriamente em relação à superfície de prata. Portanto, o campo elétrico resultante dos *plasmons* de superfície intensifica os modos vibracionais da molécula de Gly mais ou menos uniformemente. Finalmente, no espectro de SERS do complexo 2Gly@PEG/NPs, a ausência de bandas extras de Gly e a falta de intensificação das bandas de Gly sugerem que não existem moléculas de Gly disponíveis para interagir com a superfície de

prata, ou seja Gly livre. Esta hipótese é confirmada durante a análise do espectro SERS do complexo 3Gly@PEG/NPs (Fig. 5.8 e 5.9). Para a amostra 3Gly@PEG/NPs, constatou-se a presença de bandas extras a 612, 772 e 1270 cm^{-1} , evidenciando que quanto maior a concentração de Gly, vão existir mais moléculas de Gly disponíveis para interagir com a superfície de prata.

5.1.4 Viabilidade celular da Gly e do complexo Gly@PEG/NPs

Para avaliar o efeito de toxicidade na incubação da Gly no complexo PEG/NPs (Gly@PEG/NPs) e compará-la com a toxicidade da Gly livre (controle), ensaios de viabilidade celular, usando o método MTT, em células RAW foram realizados. As células RAW foram expostas a concentrações variáveis de Gly (0,001-1,0 mol/L), que foi previamente solubilizado em PBS (Gly livre) e incubadas em PEG/NPs (Gly@PEG/NPs). Os resultados destes ensaios são coletados na Fig. 5.10.

Embora ambas as amostras (Gly livre e Gly@PEG/NPs) não mostrem uma diminuição significativa na viabilidade em concentrações de até 0,2 mol.L⁻¹, a Gly livre começa a apresentar letalidade na concentração acima de 0,3 mol.L⁻¹, atingindo 35% da célula viabilidade na concentração de 1,0 mol/L. No entanto, a proliferação de células RAW foi observada durante o tratamento com Gly livre em concentrações na faixa de 0,001 a 0,2 mol/L. Posto isso, verificou-se que a amostra de Gly@PEG/NPs não mostrou uma viabilidade de células RAW reduzidas na faixa de Gly adsorvida até 1,0 mol.L⁻¹, que é uma evidência da toxicidade reduzida de Gly enquanto carregada pelas PEG/NPs.

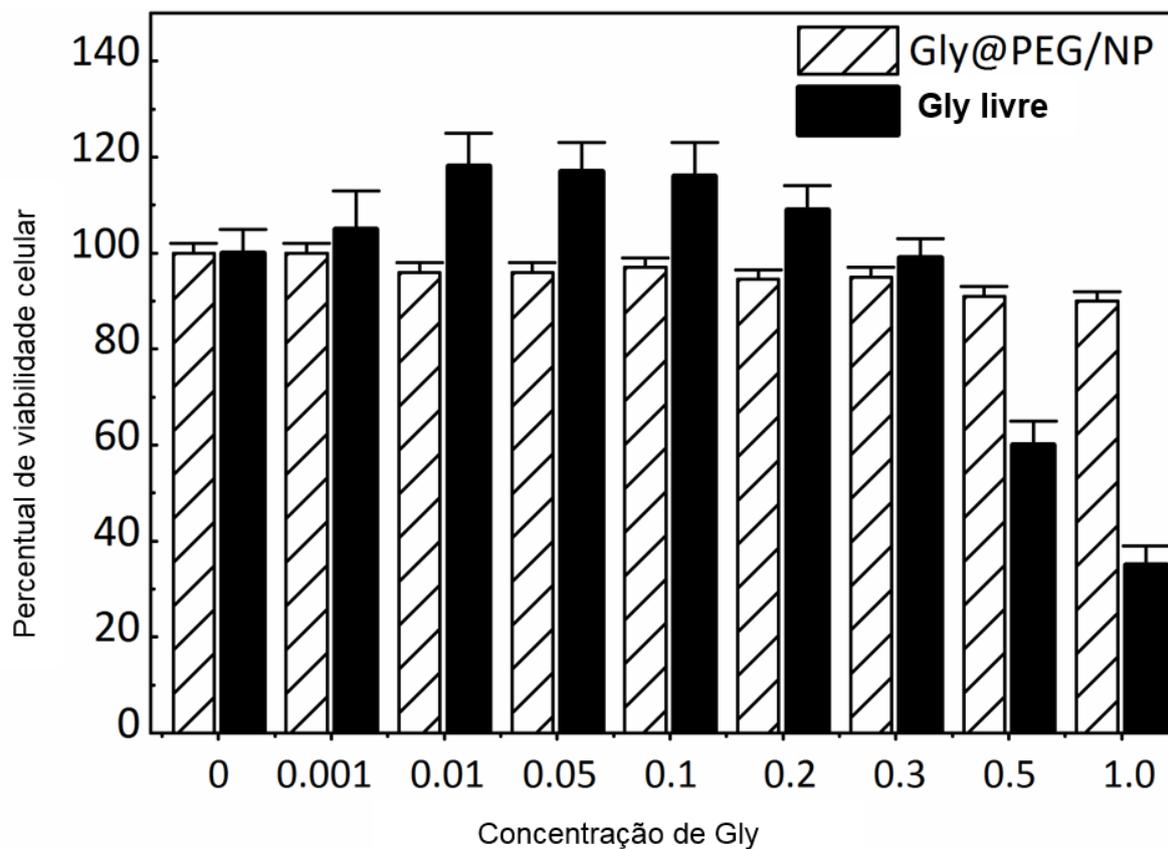


Fig. 5.10. Efeito das concentrações de Gly e Gly@PEG/NPs na viabilidade das células RAW, após 24 h de incubação como avaliado pelo ensaio de MTT. A viabilidade celular (%) foi determinada usando as células mantidas em meio de cultura como 100% de células viáveis.

5.2 – Avaliação do efeito funcional do complexo Gly@PEG/NPs em macrófagos do colostro humano (Guimarães et al. 2018b)

Como o objetivo de estudar o efeito funcional do complexo Gly@PEG/NPs na atividade microbicida, fagocítica e de produção de citocinas por macrófagos do colostro humano, ensaios de viabilidade celular, MTT e ensaios de fagocitose e de produção de citocinas estimuladas pela bactéria *Escherichia coli* (EPEC) foram realizados.

A fim de determinar a dose adequada de Gly a ser utilizada nos ensaios biológicos foi tomado como base os resultados de biocompatibilidade do complexo Gly@PEG/NPs realizados em células RAW (como descrita na seção 5.1.4), a qual demonstrou que a maior viabilidade celular ocorreu na concentração de 1 mmolL⁻¹ de Gly. Assim, passou-se a adotar esta concentração de Gly (1 mmolL⁻¹) nos ensaios envolvendo o uso do complexo Gly@PEG/NPs nas propriedades microbicidas, fagocíticas e de imunomodulação em macrófagos de colostro humano.

Estudos realizados com macrófagos do colostro sugere que as principais funções destas células são: detecção de patógenos, apresentação de antígenos, resposta inflamatória e produção de citocinas (Le Doare et al. 2017). Uma grande importância é dada ao papel das citocinas, uma vez que essas regulam o balanço do processo inflamatório.

Como dito anteriormente, a Gly é um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central com propriedades imunomoduladoras, citoprotetoras e antiinflamatórias. Os efeitos protetores da glicina provavelmente se devem ao efeito direto sobre as células-alvo ou mediadas pela inibição da ativação das células inflamatórias. Os mecanismos subjacentes não são totalmente claros. Vários mecanismos foram propostos (Zhong et al. 2003). Alguns

autores relatam que a expressão da TNF- α estaria associada a uma diminuição na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) via TNF- α (Alarcon-Aguilar 2008, Garcia-Macedo 2008, Contreras-Nuñez et al. 2018), uma vez que nos processos inflamatórios, na resposta imune e na defesa antiviral a TNF- α é o mediador central do NF- κ B (Kim et al. 2011), embora outros ativadores desse fator de transcrição também tenham sido relatados (TLRs, ROS, citocinas, fatores de crescimento, etc.) (Oeckinghaus et al. 2011). Outros trabalhos, no entanto, mostram que Gly atua suprimindo a sinalização do cálcio, ativando o canal de cloro na membrana plasmática que estabiliza ou hiperpolariza o potencial da membrana e, como consequência, bloqueia a entrada de cálcio intracelular que estimula o efeito cascata de produção de citocinas. Causando, portanto, inibição das células que ativam o processo inflamatório, muito provavelmente bloqueando a ativação de citocinas pro-inflamatórias como a TNF- α , levando a diminuição de radicais livres e outros mediadores (Mauriz et al. 2001, Cruz et al. 2008, Ikejima et al. 1997, Ishizaki-Koizumi et al. 2004).

Considerando que a concentração de Gly presente no colostro humano e leite materno é de aproximadamente 22 mg/g (Davis et al. 1993), as interações entre este aminoácido e os macrófagos presentes no leite formam um ambiente natural e ideal para um modelo experimental, o que justifica o presente estudo ao se isolar macrófagos do colostro humano para avaliar a interação do complexo Gly@PEG/NPs e sua atividade funcional (Fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas) na presença da bactéria EPEC.

A EPEC é um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracteriza-se por apresentar metabolismo aeróbio facultativo e por colonizar o trato gastrointestinal. Pode estimular vários mecanismos de ativação nas células do colostro humano. Uma delas está relacionada com a liberação de cálcio intracelular em macrófagos na

presença de Gly como descrito por Guimarães e colaboradores (Guimarães et al. 2013; Hara et al. 2013). Neste estudo, verificou-se um aumento da taxa de liberação intracelular de Ca^{2+} pelos macrófagos do colostro humano estimulado pela Gly. Este resultado sugere que o macrófago do colostro humano pode ser ativado por EPEC na produção de citocinas.

5.2.1 – Viabilidade Celular – MTT

Apesar do complexo Gly@PEG/NPs (1 mmol.L^{-1}) ter se mostrado biocompatível em células RAW, sua biocompatibilidade também foi testada em macrófagos do colostro humano, nas mesmas condições do ensaio anterior. A título de comparação, ensaios de MTT com Gly pura (1 mmol.L^{-1}) e com o complexo PEG/NPs ($0,016 \text{ mmol.L}^{-1}$) também foram realizados. Os resultados mostraram que viabilidade celular frente aos estímulos usados foi superior que 85 %.

5.2.2 – Ensaio de Fagocitose e atividade microbicida

Para avaliar a atividade fagocitária e microbicida dos macrófagos do colostro humano na presença EPEC foi utilizado o método de Alaranjado de Acridina (Belinatti-Pires et al. 1994). Os dados desses ensaios são mostrados na Tabela 5.3. Imagens da fagocitose por macrófago do colostro é mostrada na Fig. 5.11. Os resultados mostram que os macrófagos do colostro humano aumentaram sua atividade funcional quando submetido a todos os tratamentos utilizados neste trabalho (Gly pura, PEG/NPs e Gly@PEG/NPs). Contudo,

verificou-se que apenas o resultado com o tratamento com Gly pura se mostrou estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os macrófagos do colostro exibiram boa atividade fagocitária em resposta à EPEC ($72,0 \pm 4,5$ %), aumentando o índice de fagocitose significativamente na presença de Gly ($85,0 \pm 2,3$ %). Comparações entre os índices de fagocitose do complexo Gly@PEG/NPs e do complexo PEG/NPs, com relação ao grupo controle não se mostraram estatisticamente significante. Este resultado evidencia que a eficiência do complexo Gly@PEG/NPs não contribuiu, significativamente para o aumento da fagocitose dos macrófagos do colostro humano estimulados por EPEC. Este resultado está de acordo com a literatura, a qual relata que nanopartículas modificadas por PEG são compostos furtivos que aumentam o tempo de circulação e podem reduzir a interação dessas nanopartículas com as proteínas plasmáticas (Bamberger et al. 2018).

Tabela 5.3: Índice de fagocitose bacteriana e de atividade microbica por macrófagos do colostro humano determinados por alaranjado acridina. Os símbolos *, # indicam diferenças entre cada tratamento com o grupo controle (células/EPEC) e com o grupo Gly pura, ambos com $P < 0,05$.

Estimulo	Fagocitose (%)	Atividade microbica (%)
EPEC	72,0 \pm 4,5	20,0 \pm 1,5
GLY pura	85,0 \pm 2,3*	16,0 \pm 1,6 #
PEG/NPs	81,0 \pm 1,5	22,0 \pm 2,2
Gly@PEG/NPs	78,0 \pm 1,0	27,0 \pm 1,7*#

Como pode ser observado na Tabela 5.3 o grupo controle apresentou índice de atividade microbica da ordem de $20,0 \pm 1,5$ %, valor similar ($p > 0,05$) ao encontrado para os macrófagos tratados com Gly pura ($16,0 \pm 1,6$ %). O que leva a concluir que a Gly pura não

estimulou, de forma estatisticamente significativa, o aumento da atividade microbicida. Além do mais, foi também verificado que índice de atividade microbicida após o tratamento com o sistema PEG/NPs, também não foi significativamente modificado ($22,0 \pm 2,2$ %) com relação ao grupo controle. Este resultado sugere que o sistema PEG/NPs aparentemente não foram reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear. Contudo, verificou-se que os macrófagos tratados com o amplexo Gly@PEG/NPs tiveram sua atividade microbicida aumentada da ordem de 40 % com relação aos grupos controle (de 20,0 para 27,0 %: $p < 0,05$) e Gly pura (16,0 para 27,0 % - $p < 0,05$). Este resultado está de acordo com o relatado em Guimarães e colaboradores (Guimarães et al. 2013a) ao estudar a eficácia de micropartículas de PEG carregadas com Gly na atividade microbicida. De acordo com esse trabalho o aumento de eficácia da atividade microbicida está relacionado com o aumento da liberação de Ca^{2+} intracelular devido a produção de espécie reativas de oxigênio induzida pela Gly.

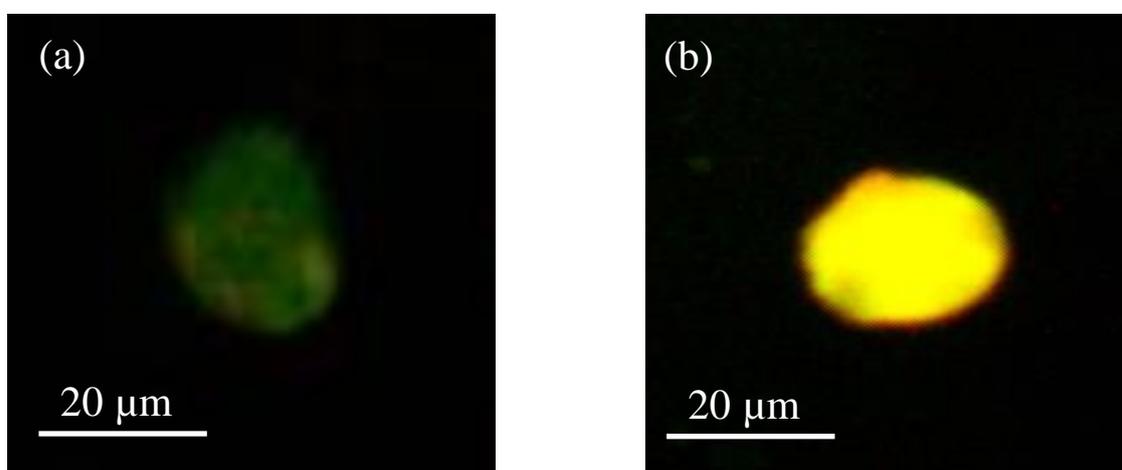


Fig. 5.11 Imagens da atividade fagocítica obtida pelo método de alaranjado de acridina: (a) fagocitose da EPEC pelo macrófago (Verde - vivo), (b) fagocitose da EPEC pelo macrófago (Laranja - morto)

5.2.3 Ensaios de imunomodulação e quantificação de citocinas

Para investigar o efeito do complexo Gly@PEG/NPs (1 mmolL^{-1}) na produção de citocinas anti e pró-inflamatórias, ensaio por citometria de fluxo com macrófago do colostro humano, estimulados por EPEC e tratados com o complexo Gly@PEG/NPs, forma realizados. Para isso, foram quantificadas as concentrações das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , 24 horas após o tratamento. Para comparação, ensaios utilizando um grupo controle (estimulado por EPEC e sem tratamento com Gly), tratados com Gly pura (1 mmol/L) (controle positivo) e NP/PEG (sem Gly) foram também realizados sob as mesmas condições do primeiro. Estes resultados são mostras na Tabela 5.4 e na Fig. 5.12 (a – d).

Tabela 5.4 Expressão de citocinas (pg/mL) em macrófagos de colostro humano após estimulação por EPEC e posterior tratamento com Gly pura, PEG/NPs e Gly@PEG/NPs. O símbolo * indica diferenças estatísticas significantes com $p < 0,05$.

Citocinas	EPEC (pg/mL)	Gly (pg/mL)	PEG/NPs (pg/mL)	Gly@PEG/NPs (pg/mL)
IL-1 β	$13,4 \pm 2,2$	$19,4 \pm 1,6^*$	$20,8 \pm 1,6^*$	$20,0 \pm 2,6^*$
IL- 4	$10,3 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,1^*$	$10,2 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,3$
IL-10	$4,1 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,2^*$
TNF- α	$12,0 \pm 0,8$	$16,3 \pm 0,7^*$	$15,9 \pm 0,5^*$	$17,2 \pm 0,3^*$

Citocinas	EPEC (pg/mL)	Gly (pg/mL)	PEG/NPs (pg/mL)	Gly@PEG/NPs (pg/mL)
IL-1 β	13,4 \pm 4,4	16,9 \pm 1,8*	20,8 \pm 1,7*	19,9 \pm 2,9*
IL- 4	10,3 \pm 0,4	12,2 \pm 0,2*	10,2 \pm 0,4	10,3 \pm 0,6
IL-6	11,8 \pm 4,6	14,2 \pm 2,0	18,5 \pm 1,7*	15,5 \pm 3,3
IL-8	19,1 \pm 1,0	19,3 \pm 2,8	19,5 \pm 1,7	20,6 \pm 3,6
IL-10	4,1 \pm 0,2	4,8 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	5,4 \pm 1,2*
IL-12	15,5 \pm 6,3	19,9 \pm 2,4	22,5 \pm 2,9*	21,3 \pm 2,7*
IL - 17	5,0 \pm 1,6	4,7 \pm 0,8	4,6 \pm 0,6	7,1 \pm 3,8*
TNF- α	12,0 \pm 0,8	16,3 \pm 0,7*	15,9 \pm 0,5*	17,2 \pm 0,3*
IFN- γ	3,2 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2	3,5 \pm 0,5

Como pode ser verificado na Tabela 5.4 as citocinas IL - 8 e IFN- γ não mostraram variações estatisticamente relevantes em nenhum dos grupos de amostras aqui estudadas. Contudo, foi verificado que o tratamento com o complexo Gly@PEG/NPs modulou a produção de IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α , aumentando suas expressões, com relação grupo controle em aproximadamente 50, 30, 40, 40 e 40%, respectivamente. Enquanto que o tratamento com a Gly pura levou ao aumento da expressão de IL-1 β , IL-4, TNF- α em aproximadamente 25, 20 e 35 %, respectivamente. Por último, o uso do carreador NP/PEG elevou a produção de IL-1 β , IL - 6, IL - 12 e TNF- α com relação ao grupo controle, em aproximadamente 55, 55, 45 e 30%, respectivamente.

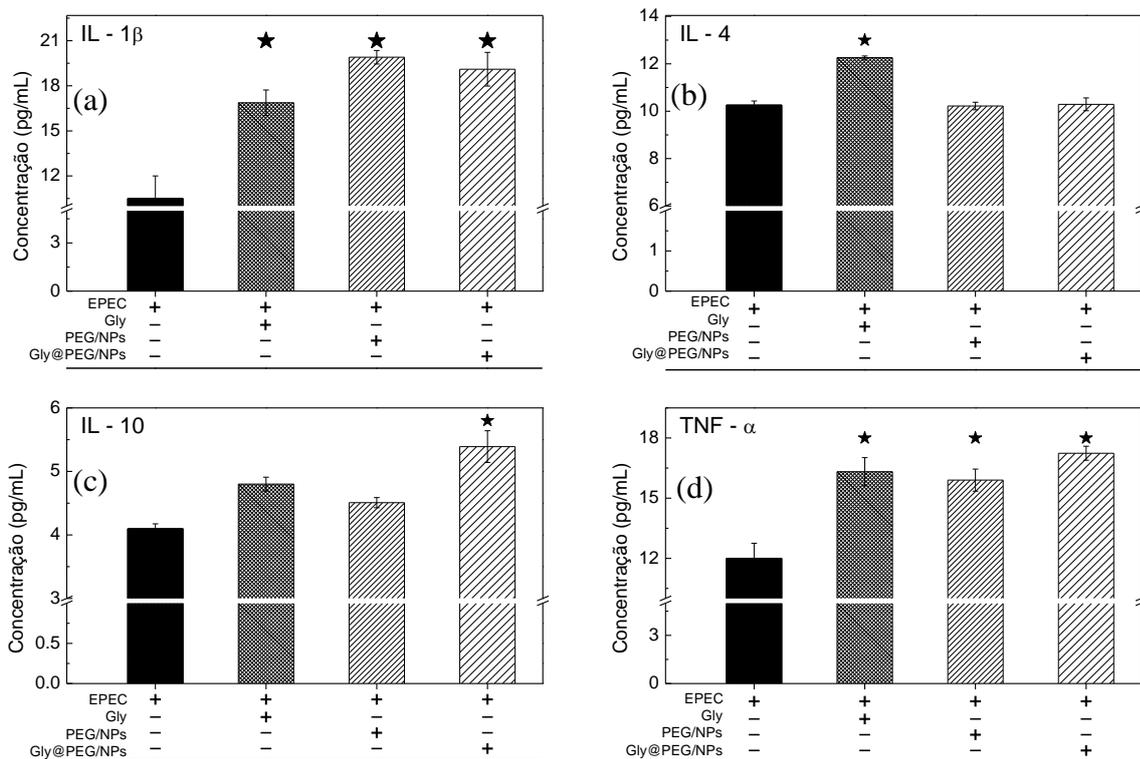


Fig. 5.12 Expressão de citocinas por macrófagos de colostro humano (a) IL-1 β , (b) IL-4, (c) IL-10 e (d) TNF- α após estimulação por EPEC e posterior tratamento com Gly pura, PEG/NPs e Gly@PEG/NPs. O símbolo * indica diferenças estatisticamente significante com $p < 0,05$.

Como relatado anteriormente, o PEG por ser um polímero biocompatível tem sido amplamente utilizado na área biomédica. De modo geral, os nanomateriais, quando têm suas superfícies modificadas com PEG (PEGlação) podem suprimir a adsorção por opsonina e a depuração subsequente pelo sistema fagocitário mononuclear, prolongando assim o tempo de circulação (Dorati et al. 2007; Kumari et al. 2010; Corrêa et al. 2011; Hara et al. 2013; Machado et al. 2015). Contudo, os resultados aqui apresentados demonstraram que apesar da presença das NPs de PEG não ter influenciado, de forma estatisticamente significante, o índice de atividade microbicida após o tratamento com o sistema PEG/NPs, esse contribuiu para o aumento das expressões de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) pelos macrófagos do colostro humano. Esse resultado está de acordo com o observado no

trabalho de Bamberger e colaboradores, ao estudar o efeito da modificação, por PEGilação, da superfície de NPs de polissacarídeos, nas propriedades fisiológicas de diferentes tipos primários de células imune (Bamberger et al. 2017). Nesse trabalho, foi verificado que a PEGilação diminui a captação celular inespecífica das NPs recobertas com PEG por macrófagos e células dendríticas, mas aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias com a TNF- α e a IL-6.

Os ensaios envolvendo o uso da Gly (Gly pura e Gly@PEG/NPs), mostraram que tanto as citocinas anti- quanto as pro-inflamatórias tiveram suas expressões aumentadas após os tratamentos. Sugerindo um equilíbrio entre esses mediadores, uma vez que é característico dos componentes imunológicos do colostro agir em conjunto, sem causar uma resposta inflamatória (Cubero et al. 2009). Contudo, como pode ser observado na Tabela 5.4 e na Fig. 5.12, foi observado um aumento, estatisticamente significativo das citocinas IL-1 β e TNF- α para todos os grupos tratados. Foram também observados aumentos estatisticamente significativos dos teores das citocinas IL-12 e IL – 17 para o grupo tratado com o complexo Gly@PEG/NPs e das citocinas IL – 6 e IL – 12 o grupo tratado com o complexo PEG/NPs. A citocina IL-17 é produzida tipicamente pelo subgrupo de células T (Th17), contudo, estudos demonstram que os macrófagos também expressam citocinas Th17 (Gu et al. 2008). Em geral os efeitos da Th17 estão associados aos mecanismos subjacentes da condição de inflamação. Por outro lado, a presença de IL – 17 prejudica a apoptose por monócitos/macrófagos e induz intensa diferenciação, garantindo remoção eficiente de neutrófilos apoptóticos e restauração de condições anti-inflamatória e sugere um papel inesperado da IL–17 na resolução da inflamação (Sakaguchi 2005), que pode ser importante durante a fagocitose e processo microbicida por macrófagos.

O aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias (principalmente a TNF- α) não é um comportamento esperado, ao menos para o grupo tratado com Gly pura, uma vez que existem diversos trabalhos na literatura que mostram que a Gly reduz o teor da citocina TNF- α (Ikejima et al. 1997; Spittler et al. 1999; Ikejima et al. 1997; Alarcon-Aguilar et al. 2008; Ishizaki-Koizumi et al. 2004; Garcia-Macedo et al. 2008) Embora, os mecanismos pelos quais a Gly regula as expressões das citocinas, não serem ainda totalmente compreendidos, tem sido reportado que a Gly (ao menos em sistemas *in vitro*) reprime a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em monócitos, células de Kupffer e 3T3-L1 (Ikejima et al. 1997; Alarcon-Aguilar et al. 2008; Garcia-Macedo et al. 2008) e estimula a expressão de citocinas anti-inflamatória IL – 10 (também em monócitos) (Spittler et al. 1999).

Fazendo uma pesquisa na literatura pode-se verificar que, apesar de se notar uma redução de TNF- α após o tratamento com Gly, observa-se uma grande diversidade de resultados. Essa diversidade de resultados provavelmente está relacionada aos diferentes sistemas biológicos estudados e a metodologia empregada (tipo de estímulo, tempo de incubação, dose de Gly usada, entre outros). No trabalho de Garcia-Macedo e colaboradores (Garcia-Macedo et al. 2008) foi mostrado que, quando células 3T3-L1 (as quais foram diferenciadas de fibroblastos para adipócitos) são cultivadas na presença de 10 mmol/L de Gly, a expressão de TNF- α decresce em fibroblastos (20%) mas não em adipócitos. Por outro lado, Ishizaki-Koizumi e colaboradores relatam que o uso de Gly, nas concentrações de 1 e 10 mmol/L, reduzem (em células de Kupffer) os teores de TNF- α em 10 e 40%, respectivamente. As medidas foram realizadas 4 h após o estímulo com LPS (Ishizaki-Koizumi et al. 2004). Por fim, Spittler e colaboradores ao estudarem monócitos humanos cultivados em diferentes concentrações de Gly pura por 40 h e em seguida estimulados com LPS (1 mg.L⁻¹)

verificaram que as expressões das citocinas IL-10, IL-1 β , TNF- α são dependentes do tempo de estimulação e da dose de Gly usada no cultivo (Spittler et al. 1999). Eles verificaram que a TNF- α tem seu teor aumentado até 6 h, pós-estimulação e em seguida sua expressão é rapidamente reduzida. Além do mais, foi verificado que o uso de 2 mmolL⁻¹ de Gly (usados durante o cultivo dos monócitos) reduziu a produção de TNF- α em aproximadamente 50%. Contudo, medidas realizadas 24 h após o estímulo com LPS, mostraram que o efeito da Gly na redução do TNF- α é praticamente desprezível (Spittler et al. 1999).

Assim, com base na discussão acima e lembrando que nesse trabalho a dose de Gly utilizada foi de 1 mmol.L⁻¹ e os teores das citocinas foram obtidos 24 h após a estimulação com EPEC, é razoável supor que as pequenas variações nos teores TNF- α (estatisticamente não significantes) observadas entre as amostras tratadas com Gly pura e com o complexo Gly@PEG/NPs, quando comparado com as amostras tratadas apenas com PEG/NPs, estão provavelmente relacionadas a baixa dose de Gly ou ao longo tempo de exposição a EPEC. Ou seja, se as medidas do teor de TNF- α tivessem sido realizadas no período de 4 – 8 horas após a estimulação, provavelmente as variações nos teores de TNF- α teriam sido mais significativos. Contudo, para comprovar esta hipótese novos estudos devem ser realizados.

No que diz respeito às citocinas anti-inflamatórias, foi verificado que apesar de presente em ambos os grupos tratados com Gly (Gly pura e Gly@PEG/NPs) as citocinas IL-4 e IL-10 não foram expressadas simultaneamente em ambos os grupos. Constatou-se apenas que, as expressões de IL- 4 e IL-10 somente foram estatisticamente significantes nas amostras tratadas com Gly pura e Gly@PEG/NPs, respectivamente.

As interleucinas IL-4 e IL-10 são citocinas com características anti-inflamatórias, produzidas principalmente por células T (Th2). Ambas as interleucinas agem como fator de diferenciação para as células T citotóxicas, diminuindo a função secretora de citocinas por (Th1) e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2, contribuindo assim para redução de processos anti-inflamatórios. Levando-se em conta que a Gly possui propriedades citoprotetora e anti-inflamatórias, é esperado que o tratamento com a Gly induza a produção de IL-4 e IL-10 (Narayan et al. 2017; Cifuentes-Zúñiga et al. 2017).

Contudo, assim como a TNF- α , a expressão das citocinas IL-4 e IL-10 também são dependentes do tempo de estímulo e da dose de Gly (Spittler et al. 1999). Foi relatado que o tratamento com 10 mmol/L de Gly levou a um aumento de três vezes do teor de IL-10 após 6 h, com produção máxima em ~ 12 h; a 2 mmol.L⁻¹, o nível mais elevado de IL-10 foi medido após 24h. O máximo da produção de IL-10 sem o tratamento com Gly foi observado em 24 h após a estimulação com LPS. Em todos os casos foi verificado que o teor de IL-10 nas amostras cai após a ocorrência de seu máximo. Portanto, estes resultados sugerem que a Gly contribui para antecipação da produção máxima de IL-10 (Spittler et al. 1999). Levando-se em conta que no presente estudo a dose de Gly pura foi de 1 mmol.L⁻¹, pode se supor com base nos dados de Spittler e colaboradores (Spittler et al. 1999), que a produção máxima de IL-10 nas amostras tratadas com Gly pura, aqui investigadas, se daria em aproximadamente 18 h. Em complemento, em virtude da adsorção da Gly nas NP/PEG (Gly@PEG/NPs), é razoável supor que o máximo da produção de IL-10 ocorra após as 24 h do tratamento. Estas considerações estão de acordo com a observação de IL-10 ($p < 0,004$) apenas nas amostras tratadas com o complexo Gly@PEG/NPs, uma vez que os teores das citocinas presentes no meio foram avaliados 24 h após tratamento com Gly.

Além do mais, estudos de imunomodulação do complexo Gly@PEG/NPs, por correlação de Pearson (Pearson and Whiteley 1899) mostram que a produção de IL – 10 está correlacionada com a produção de IL-1 β (R = 0.94 e p = 0.01) e TNF- α (R = 0.96 e p = 0.006). De fato, como relatado anteriormente essas citocinas tiveram suas expressões aumentadas em aproximadamente 55 e 30%, respectivamente. Correlações de Pearson estatisticamente significantes também foram observadas para o tratamento com Gly pura. Nesse caso, foi verificado que a maior expressão de IL- 4 (+ 30%) se correlaciona com a produção de TNF- α (R = 0.89 e p = 0,003), a qual foi aumentada em ~ 30%. Por último, não foi observado quaisquer correlações de Pearson, estatisticamente significantes, nos macrófagos tratados com o sistema PEG/NPs.

Assim, levando-se em conta que as citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e que a produção de citocinas pro- e anti-inflamatórias na lesão pode se manifestar sistematicamente com a instabilidade hemodinâmica ou com os distúrbios metabólicos, associada com o aumento da atividade microbiana promovida pela presença do complexo Gly@PEG/NPs, leva a sugerir que esse sistema nanoparticulado pode oferecer importantes implicações clínicas durante as infecções.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

Neste estudo, verificou-se que o tamanho médio das Gly@PEG/NPs foi de 54 nm e sua morfologia é não esférica, parcialmente organizada alternando regiões amorfas e regiões cristalinas. Nota-se que as PEG/NPs e as Gly@PEG/NPs são muito semelhantes quanto a morfologia.

Verificou-se neste trabalho que o tamanho médio das PEG/NPs avaliadas por DLS foi do tamanho de 190 nm até 15 dias, 320 nm em até 45 dias e acima de 540 após 60 dias, e as Gly@PEG/NPs apresentaram o mesmo tamanho médio aproximado, sofrendo uma pequena variação quando adsorvidas com glicina.

Neste estudo, uma suspensão coloidal biocompatível baseada em nanopartículas de PEG carregadas com glicina (Gly) (Gly@PEG/NPs) foi desenvolvida utilizando apenas PBS como meio aquoso. A espectroscopia Raman normal e intensificada por superfície (SERS) foi usada com sucesso para investigar a interação da molécula de Gly carregada nas nanopartículas de PEG. Para comparação, a molécula de Gly livre também é investigada pela técnica SERS. As mudanças vibracionais observadas nos espectros de FTIR, Raman e SERS sugerem fortemente que a proximidade dos grupos amino protonados (NH_3^+) da molécula de Gly promove um aumento na conformação tipo-*gauche* em torno da ligação C-C da molécula de PEG, que favorece a formação de pontes de hidrogênio na cadeia polimérica do PEG, enquanto liga as moléculas de Gly aos átomos de oxigênio da molécula de PEG por meio de ligações de hidrogênio. Os dados também forneceram fortes evidências de que o grupo carboxilato (COO^-) da molécula Gly estão voltados para fora do complexo Gly@PEG/NPs e orientados aleatoriamente em relação à superfície da nanopartículas de PEG.

Ensaio, usando método MTT, realizados em células RAW 264.7 e em macrófagos de colostro humano, mostraram o complexo Gly@PEG/NPs apresenta viabilidade celular superior a 85%. Além do mais, bioensaios realizados em macrófagos do colostro humano estimulados pela bactéria EPEC revelaram, apesar de não ter sido reconhecidos pelos macrófagos, o complexo Gly@PEG/NPs, foi capaz de aumentar a atividade microbicida e a produção tanto de citocinas antiinflamatórias quanto de citocinas pro-inflamatórias.

Assim, a presente investigação abre caminho para entender a interação de nanopartículas poliméricas com aminoácidos de modo a permitir o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas capazes de modular a atividade funcional do sistema imunológico.

Perspectivas Futuras

- Preparar complexos Gly@PEG/NPs com diferentes teores de Gly ($0,01 - 1 \text{ molL}^{-1}$) e em sistemas *in vitro*, e determinar os teores de citocinas produzidos em função do tempo de tratamento e do tempo de estímulo.
- Realizar bioensaios utilizando o complexo Gly@PEG/NPs em sistemas *in vivo*.

CAPÍTULO 7 - REFERENCIAS

- Abbas A K. **Imunologia Celular e Molecular**. 5. ed. ed, ed. A.H.L. Abul K. Abbas. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessia H. **Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations**. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58, 1688-1713, 2006.
- Alarcon-Aguilar F J, Almanza-Perez J, Blancas G, Angeles S, Garcia-Macedo R. Roman R, Cruz M. **Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice**. *Eur. J. Pharmacol.* 599, 152-158, 2008.
- Alceu Júnior A J, Mizumukai I, Santos A F S. **“Papel da glicina em marcadores bioquímicos da doença não-alcoólica do fígado gorduroso (NAFLD) induzida por dieta deficiente em metionina e colina”**. *Nutrire*, 36, 146-146, 2011.
- Alle N, e Filho N e Alle. **“Anti-inflammatory properties of some drug (indomethacin, phenyl-butazone, sulindac, naproxen, bensydamine and niflumic acid), on accute phases of inflammation in rats”** *Rev. Odontol. Univ. São paulo*, 6, 31-6, 1992.
- Alper J S, Dothe H, Lowe M A. **Scaled quantum mechanical calculation of the vibrational structure of the solvated glycine zwitterion**. *Chem. Phys.* 161, 199–209, 1992.
- Anderson D. **Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage**. *Mutation Research*, Amsterdam, 350, 103-108, 1996.
- Andrade C T, Coutinho F M B, Dias M I, Flucas E, Oliveira C M F & Tabak D. **Compêndio de nomenclatura macromolecular**. 1ª edição. Vol. vol. 1. e-papers editora, 2002.
- ANVISA. **“Farmacopeia Brasileira.”** ANVISA Volume 1: 546P, 2010.
- Aprison, M H. Werman, R. **“The distribution of glycine in cat spinal cord and roots”** *Life sci.*, 4:2075–2083, 1965.
- Assumpção I R, Rodrigues M. Barbieri B. **“Tratamento da retocolite ulcerativa inespecífica em crianças com enemas contendo butirato”**. *Arq gastroenterol*, 36, 228-23, 1999.
- Azevedo M M. **Nanoesferas e liberação controladas de fármacos. Laboratório de química do estado sólido. Instituto de química**. Campinas: Unicamp, 2002.

- Bai Y J, Wang CvG, Lun N, Wang Y X, Yu M J, Zhu B. **HRTEM microstructures of PAN precursor fibers.** Carbon 44, 1773–1778, 2006.
- Bamberger D, Hobernik D, Konhauser M, Bros M, Wich P R. **Surface Modification of Polysaccharide-Based Nanoparticles with PEG and Dextran and the Effects on Immune Cell Binding and Stimulatory Characteristics.** Mol. Pharmaceutics, 14, 4403–4416, 2017.
- Begum R e Matsuura H, **Conformational properties of short poly(oxyethylene) chains in water studied by IR spectroscopy.** J. Chem. Soc. Faraday Trans. 93, 3839–3848, 1997.
- Bellinati-Pires, R Melki, S E Colleto, G M D D and Carneiro-Sampaio, M M S. "Evaluation of a fluorochrome assay for assessing the bactericidal activity of neutrophils in human phagocyte dysfunctions". Journal of Immunological Methods, 119, 189-196, 1989.
- Belló C, Schemberger J A, Machado W M, Fernandes D, Velloso J C R. "O cetoprofeno como oportunidade terapêutica no estresse oxidativo: uma revisão". Rev Ciênc Farm Básica Apl. 36(1):123-129, 2015.
- Bianchi M L P, Antunes L M G. **Free radicals and the main dietary antioxidants.** Rev. Nutr., Campinas, 12, 123-130, 1999.
- Calceti P, Salmaso S, Walker G, Bernkop-Schnürch A. "Development and in vivo evaluation of an oral insulin–peg delivery system". Eur. J. Pharm. Sci., 22, 315–323, 2004.
- Catauro M, Bollino F, Papal e F, Gallicchio M, Pacifico S. **Synthesis and chemical characterization of new silica polyethylene glycol hybrid nanocomposite materials for controlled drug delivery.** J. Drug Del. Sci. Tech. 24, 320–325, 2014.
- Chen F, Liu C, Weia J, Chen X, Zhao Z, Gao Y. "Preparation and characterization of injectable calcium phosphate cement paste modified by polyethylene glycol-6000". Mater. Chem. Phys. 125, 818–824, 2011.
- Chinen I, kimura A, Nakahama T, Masuda k, kishimoto T. "Aryl hydorcarbon receptor mediates suppression of colon inflammation induced by dextran sulfate sodium". Cytokine 52, 17–34, 2010.
- Chiou W L and Riegelman S J. "Pharmaceutical applications of solid dispersion systems." J. Pharm. Sci. 60, 1281-1302, 1971.
- Christiansen Ole B. "Reproductive immunology" Molecular immunology 55, 8– 15, 2013.
- Ciprandi G, Marsegli G L, Klesy C, Tosca M A. **Relationships between allergic inflammation and nasal airflow in children with persistent allergic rhinitis due to mite sensitization.** Allergy, 60, 957-960, 2005.

Colombo A M J, Valente Filho J M, Moreira D M. “**Effects of Chocolate in the Endothelial Function of Patients with Acute Coronary Syndrome**”. *Int J Cardiovasc Sci.* 28(2), 89-94, 2015.

Contreras-Nuñez E, Blancas-Flores G, Cruz M, Almanza-Perez J C, Gomez-Zamudio J H, Ventura-Gallegos J L, Zentella-Dehesa A, Lazzarini R, Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar F J. **Participação do complexo IKK- α/β na inibição da via do TNF- α / NF- κ B pela glicina: Possível envolvimento de um receptor de membrana específico para adipócitos**, *Biomedicina e Farmacoterapia.* 10, 120-131, 2018.

Corrêa E M, Vila M M D C, Junior J M O, Zaparoli R E, Granato M M, Goes A L, Moraes L C, Paula F C e Chaud M V. “**Assessment of solubility and intestinal absorption in vitro of praziquantel in solid dispersions of polyethylene glycol 6000**”. *Lat. Am. J. Pharm.* 30, 1910-5, 2011.

Cruvinel W M, Mesquita Júnior D, Araújo J A P, Catelan T T T, Souza A W S, Silva N P, Andrade L E C. **Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. *Rev Bras Reumatol* 50, 434-61, 2010.

Cruz M, Maldonado-Bernal C, Mondragon-Gonzalez R, Sanchez-Barrera R, Wachter N H, Carvajal-Sandoval G & Kumate J. **Glycine treatment decreases proinflammatory cytokines and increases interferon- γ in patients with type 2 diabetes**. *Journal of endocrinological investigation*, 31, 694-699, 2008.

Cubero C L, Rodríguez J, Franco A B, Bravo L and Barriga C. **Analysis of the antioxidant activity in humanmilk, day versus night**. *Cellular and Membrane Free Radical Research*, vol. 1, pp. 100–101, 2009.

Cuevas, A., Febrero, M., & Fraiman, R. **An anova test for functional data**. *Computational statistics & data analysis*, 47(1), 111-122, 2004.

Curfs J H, Meis J F, Hoogkamp-Korstanje J A – **A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers**. *Clin Microbiol Rev.* 10, 742-780, 1997.

Curtis D R, Watkins J C. “**The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids**” *J. Neurochem.* 6, 117–141, 1960.

David A I, Coelho M P V, Paes A T, Leite A K, Guardia B D, Almeida M D, Meira S P, Rezende M B, Afonso R C, Ferraz-Neto B-H. “ **Liver transplant outcome: a comparison between high and low MELD score recipients**”. *Einstein.* 10(1), 57-61, 2012.

Davis T A, Fiorotto M L, Reeds P J. “**Amino acid compositions of body and milk protein change during the suckling period in rats**” *J nutr.* 123, 947–956, 1993.

Davis T A, Nguyen H V, Garcia-Bravo R, Fiorotto M L, Jackson E M, Lewis D S, Lee D R, Reeds P J. **“Amino acid composition of human milk is not unique.”** J nutr. 124, 1126–1132, 1994.

Dorati R, Genta I, Colonna C, Modena T, Pavanetto F, Perugini P, Conti B. **“Investigation of the degradation behavior of poly(ethylene glycol-co-d,l-lactide) copolymer”.** Polym. Degrad. Stab. 92, 1660-1668, 2007.

Dou X, Jung Y M, Yamamoto H, Doi S, Ozaki Y. **Near-infrared excited surfaceenhanced raman scattering of biological molecules on gold colloid i: effects of ph of the solutions of amino acids and of their polymerization.** Appl. Spectrosc. 53, 133–138, 1999.

Elvassore N, Bertucco A, Caliceti P. **“Production of insulin-loaded poly (ethylene glycol)/poly(l-lactide) (peg/pla) nanoparticles by gas antisolvent techniques”.** J. Pharm. Sci. 90, 1628–1636, 2001.

Evins E, Fitzgerald S M, Wine L, Rosselli R, **Goff D C. Placebo-controlled trial of glycine added to clozapine in schizophrenia.** Am. J. Psychiatry 157, 826–828, 2000.

Fagundes D L, França E L, Hara C C P, Honorio-França A C. **“Immunomodulatory effects of poly(etilene glicol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes”** Int. J. Pharmacol. 1, 1-9, 2012.

Falcon-Rodriguez C I, García-Alonso L I, Segura-Medina P. **Particulate matter inside of the alveolar macrophage.** Acta toxicol. argent. 1, 20 - 25, 2017.

Ferrari, M. **“Cancer nanotechnology: opportunities and challenges”.** Nature Reviews. Cancer 5, 161–171, 2005.

Ferreira S S, Passos C P, Madureira P, Vilanova M, Coimbra M A. **“Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides”.** A review Carbohydrate Polymers, 132, 378-396, 2015.

Figueiredo J A, Petroianu A, Correia M I T D, Castro-Júnior H A, Peschit W S, Silveira R O P, Nunes C B, Abrantes M M. **“Effect of the nutritional Supplementation with glicine and glutamine, oral Feeding, in the colonic cicatrization in rabbits.”** Rev. Col. Bras. Cir. 36, 148-151, 2009.

Ford J. **“The current status of solid dispersions”.** Pharm. Acta helv. 61, 69-88, 1986.

França E L, Bittencourt R V, Fujimori M, Morais T C, Calderon I M P, Honorio-França A C. **Human colostrum phagocytes eliminate enterotoxigenic Escherichia coli opsonized by colostrum supernatant.** Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 44, 1-7, 2011a.

França E L, Hara C C P, Fagundes D L G, Lima N A P, Ratto S H B, Honório-França A C. **Fluctuation in the Functional Activity of Human Colostrum Phagocytes to Streptococcus pneumoniae and Enteropathogenic Escherichia coli.** J Medical Microbiol Diagnosis. 1, 1-6, 2012.

França E L, Junior A P, Honório-França A C, Furlan F, Ferrari C K B. “**Semelhança de alimentos funcionais e biomateriais com relação à tolerância imunológica**”. Simbiologias. 3, 118-134, 2010.

França E L, Maynié J C, Correa V C, Pereira U CR, Batalini C, Ferrari C K B, Honório-França A C. **Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes.** Int J Phytomed. 2, 354- 362, 2010.

França E L, Pereira Jr A, Oliveira S L, Honório-França A C. **Chronoimmunomodulation of melatonin on bactericidal activity of human blood phagocytes.** Intern J Microbiol. 6, 1-13. 2009.

França, E L, Morceli G, Fagundes D L G, Rudge M V C, Calderon I M P, Honório-França A C. **Secretory IgA? Fca receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics.** APMIS. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 119, 710-719, 2011b.

França-Botelho A C, Honório-França A C, França E L, Gomes M A & Costa-Cruz J M. **Phagocytosis of Giardia lamblia trophozoites by human colostrum leukocytes.** Acta paedri. 95, 438-443, 2006.

Fuertges A e Abuchowski F. “**The clinical Efficacy of poly(ethylene glycol)- modified proteins**” journal Of controlled release 11, 139–148, 1990.

Fujimori M, França E L, Fiorin V, Morais T C, Honório-França A C, De Abreu L C. **Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers.** BMC Pregnancy and Childbirth (Online), 15, 166, 2015.

Furukawa H, Sing S K, Mancusso R, Gouaux E. **Subunit arrangement and function in NMDA receptors.** Nature 438, 185–192, 2005.

Gang Ruan, Si-Shen Feng **Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel.** Biomaterials. 24, 5037-5044, 2003.

Garcia-Macedo R, Sanchez-Muñoz R, Almanza-Perez J C, Duran-Reyes G, Alarcon-Aguilar F, Cruz M. **Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells,** European Journal of Pharmacology, 587, 317–321, 2008.

Gazzani M A, Grusak G. “**Functional foods and their expanding applications in the improvement of human health**”. Food biotechnology. 23, 127–128, 2012.

Geralo V P, Pavinatto F J, Nobre T M, Caseli L & Oliveira Jr O N. **Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids**. Chemical Physics Letters, 559, 99-106, 2013.

Goldblum R M and Goldman A S. **Immunological Components of Milk: Formation and Function**. In: **Handbook Mucosal Immunology**. Academic Press. 1, 643-652, 1994.

Gomes F, Telo D F, Souza H P, Nicolau J C, Halpern A, Serrano JrC V. “ **Obesity and Coronary Artery Disease: Role of Vascular Inflammation**.” Arq Bras Cardiol 94(2) 273-279, 2010.

Gomes-Leal W. “**Inflamação aguda, resposta glial e degeneração axonal em um modelo de excitotoxicidade na medula espinhal 20d2**” Pós-graduação ciências biológicas - Neurociências. 197, 2002.

Goryainov S V, Boldyreva E V, Kolesnik E N. **Raman observation of a new (f) polymorph of glycine?** Chem Phys. Lett. 419, 496–500, 2006.

Gu Y, Yang J, Ouyang X, Liu W, Li H, Yang J, Bromberg J, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H. **Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells**. European Journal Immunology, 38(7), 1807–1813, 2008.

Guimarães P C L, Honorio-França A C, Hara C C P, Fagundes D L G, Ratto S H B, França E L. “**Modulation of human colostrum phagocyte activity by the glycineadsorbed polyethylene glycol microspheres**”. Journal Of chemistry. 8, 1-8, 2013.

Guimarães P C L, da Silva J R, de Azevedo R B, Morais P C e da Silva S W. **Fabrication and characterization of glycine-loaded PEG nanoparticles for drug delivering: A comprehensive SERS study**. Applied Surface Science, 450, 396-403, 2018a.

Guimarães P C L, França E L, Honorio-França A C, de Azevedo R B, Morais P C e da Silva S W. **Polyethyleneglycol nanoparticles adsorbed to glycine as a bioengineered neomaterial for application in inflammatory processes**. International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS). 5, 1 - 7, 2018b.

Guimarães T T, Terra R, Dutra P M L. **Chronic effects of exhausting exercise and overtraining on the immune response: Th1 and Th2 profile**. Motricidade. 13, 69-78, 2017.

Halliwell B. “**Free radicals and antioxidants: a personal view**.” Nutrition Reviews 52, 253-265, 1994.

Hara C C P, Honorio-França A C, Fagundes D L G, Guimarães P C L and França E L. “ **Melatonin nanoparticles adsorbed to polyethylene glycol microspheres as activators of human colostrum macrophages**” *Journal Of nanomaterials*.8, 1-8, 2013.

Hartog A L I, Van Der kraan P M, Garssen J. “**Antiinflammatory effects of orally ingested lactoferrin and glycine in different zymosan-induced inflammation models: evidence for synergistic activity.**” *Int immunopharmacol* 7, 1784–1792, 2007.

He M, Lau N G S W, Bhatia M. “**Chemokines in acute inflammation: regulation, function and therapeutic strategies**”. *Int. J. integr. biol.* 1:18, 2007.

Henning T. **Polyethyleneglycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. Fine, Specialty & Performance Chemicals.** *PharmaChemical* 1, 57–59, 2002.

Herne T M, Ahern A M, Carrel R L, **Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides: preferential N-terminal adsorption on colloidal silver.** *J. Am. Chem. Soc.* 113, 846–854, 1991.

Herrera M T, Artunduaga J J, Ortiz C C, Torres R G. **Synthesis of antibiotic loaded polylactic acid nanoparticles and their antibacterial activity against Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** *Biomédica.* 37, 11-21, 2017.

Hitchcock A M, Costello C E, and Zaia J. **Glycoform Quantification of Chondroitin/Dermatan Sulfate Using a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Platform†.** *Biochemistry*, 45, 2350–2361, 2006.

Honorio-França A C, Carvalho M P, Isaac L, Trabulsi L R And Carneiro-Sampaio M M S. **Colostrual mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic Escherichia coli opsonized with colostrual IgA.** *Scand. J. Immunol.* 46, 59-66, 1997.

Honorio-França A C, Hara C C P, Ormonde J V S, Nunes G T, França E F. **Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrual phagocytes.** *J Appl Biomed.* 11, 153–162, 2013.

Honorio-França A C, Launay P, Carneiro-Sampaio M M S, Monteiro R C. **Colostrual neutrophils express iga fc receptors (cd89) lacking y chain association that mediate non inflammatory properties of secretory IgA.** *J Leukoc Biol.* 69, 289-296, 2001.

Honorio-França A C, Rudge M V C, Oliveira S L, Ramos M D, Calderon I M P. **Avaliação da resposta imune materna e fetal de ratas diabéticas.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Impresso)*, São Paulo, 18, 233-238, 1996.

Houschyar K S, Chelliah M P, Rein S, Maan Z N, Weissenberg K, Duscher D, Branski L K and Siemers F. **Role of Wnt signaling during inflammation and sepsis: A review of the literature.** The International Journal of Artificial Organs 41, 1–7, 2017.

Huang Y Y, Chung T W, Tzeng T W. “**A method using biodegradable polylactides/ polyethylene glycol for drug release with reduced initial Burst**”. Int j pharm. 182, 93-100, 1999.

Huang Y Y, Chung T W, Tzeng T W. “**A method using biodegradable polylactides/ polyethylene glycol for drug release with reduced initial Burst**”. Int j pharm. 182, 93-100, 1999.

Ikejima K, Qu W, Stachlewitz R F, Thurman R G. **Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel,** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 272, G1581–G1586, 1997.

Ishizaki-Koizumi S, Sonaka I, Takei Y, Ikejima K, Sato N. **The glycine analogue, aminomethanesulfonic acid, inhibits LPS-induced production of TNF- α in isolated rat Kupffer cells and exerts hepatoprotective effects in mice,** Biochemical and Biophysical Research Communications 322, 514–519, 2004.

Jacob T, Ascher E, Hingorani A, kallakuri S. “**Glycine prevents the Induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat Model.**” Surgery 66, 134 – 457-466, 2003.

Kallakuri S, Ascher E, Pagala M, Gade P, Hingorani A, Scheinman M, Mehraein k, Jacob T. “**Protective effect of glycine in Mesenteric ischemia and reperfusion injury in a rat model**”. J vasc surg. 38, 13-20, 2003.

Kang L, Xu P, Chen D, Zhang B, Du Y, Han X, Li Q, Wang H L. **Amino acidassisted synthesis of hierarchical silver microspheres for single particle surface-enhanced raman spectroscopy.** J. Phys. Chem. C 117, 10007–10012, 2013.

Katsung, B G. **Farmacologia (básica & clínica).** Rio de Janeiro: 6 ed. Guanabara koogan p 408-423, 1998.

Khlebtsov N, Dykman L. **Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies.** Chem. Soc. Rev. 40, 1647-1671, 2011.

Kim J Y, Morgan M, Kim D G, Lee J Y, Bai L, Lin Y, Liu Z G, Kim Y S. **TNF- α induced non-canonical NF- κ B activation is attenuated by RIP1 through stabilization of TRAF2,** J. Cell Sci., 124, 647-656, 2011.

Kozielski M. **Conformational changes in the chains of polyoxyethyleneglycols.** J. Mol. Liq. 128, 105–107, 2006.

- Kreuter J. **Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know?**, Adv. Drug Deliv. Rev. 71, 2-14, 2014.
- Kumar S, S Dhankhar, Arya V P, Yadav S, and Yadav J P. **“Antimicrobial activity of *Salvadora oleoides* Decne. Against some microorganisms.”** Journal of Medicinal Plants Research. 6, 2754-2760, 2012.
- Kumari A, Yadav S K, Yadav S C. **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.** Colloids Surf. B Biointerfaces 75, 1-18, 2010.
- Lago C, Landoni M, Doria E C E, Nielsen E, Pilu R. **“Study and characterization of a novel functional food: purple popcorn”**. mol breeding 31, 575–585, 2013.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst LV, Muller R N. **Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications.** Chem. Rev. 108, 2064-211, 2008.
- Le Doare K, Bellis K, Faal A, Birt J, Munblit D, Humphries H & Kampmann B. **SIgA, TGF- β 1, IL-10 and TNF α in colostrum are associated with infant Group B Streptococcus colonisation.** Frontiers in immunology, 8, 1269 - 1277, 2017.
- Leal N R F, Vigliano M V, Pinto F A. **Anti-inflammatory effect of diterpenes-enriched fractions from *Pterodon polygalaeflorus* through inhibition of macrophage migration and cytokine production.** Journal of Pharmacy and Pharmacology. 70, 808–820, 2018.
- Leandro C G, Nascimento E, Azevedo M M, Viegas A, Albuquerque C, Cavalcanti C B, Manhães-de-Castro R, Castro C M M B. **“Effect of L-Glutamine on the number of blood leukocytes and on the phagocytic function of macrophages of stressed rats”**. Rev. Nutr, Campinas. 19, 437-444, 2006.
- Lee M A, Mccauley R D, kong S E, Hall J C. **“Influence of glycine on Intestinal ischemia-reperfusion injury”**. J parenter enteral nutr. 5, 26-130, 2002.
- Lee M A, Mccauley R D, kong S E, Hall J C. **“Pretreatment with glycine reduces the severity of warm intestinal ischemic-reperfusion injury in the rat”**. Ann plast surg. 6, 46-320, 2001.
- Lee P C, Meisel D. **Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols.** J. Phys. Chem. 86, 3391–3395, 1982.
- Leite H M E. **Formulação e caracterização de matrizes de polihidroxibutirato para liberação controlada de fármacos.** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 92 f. 2004.

- León A, Reuquen P, Garín C, Segura R, Vargas P, Zapata P, Orihuela P A. **FTIR and Raman characterization of TiO₂ nanoparticles coated with polyethylene glycol as carrier for 2-methoxyestradiol.** Appl. Sci. 7, 49 - 54, 2017.
- Li L, Liu J, Yang X, Huang J, He D, Guo X, Wan L, He X, Wang K. **Biomimetic synthesis of highly biocompatible gold nanoparticles with amino acid-dithiocarbamate as a precursor for SERS imaging.** Nanotechnology. 11, 27-37, 2016.
- Lin Y, Ye S, He Y, Li S, Chen Y, & Zhai Z. **Short-term insulin intensive therapy decreases MCP-1 and NF- κ B expression of peripheral blood monocyte and the serum MCP-1 concentration in newly diagnosed type 2 diabetics.** Archives of endocrinology and metabolism. 62, 212-220, 2018.
- Lin E, Calvano S E., Lowry SF. **Inflammatory cytokines and cell response in surgery.** Surgery, v.127, p.117-126, 2000.
- Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. **“Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the “french paradox”.”** Semin thromb hemost 36, 59–70, 2010a.
- Lippi G, Franchini M, Guidi G C. **“Red wine and cardiovascular health: the ‘french paradox’ revisited.”** Int j wine res 2, 1–7, 2010b.
- Machado C M, Ebinuma V C S, Pereira J F B. **“Recuperação de Ácido clavulânico utilizando Sistemas Duas Fases Aquosas compostos por Polietileno Glicol e Sulfato de Sódio”** Rev Ciênc Farma Básica apl. 36, 1-8, 2015.
- Mahato R I. **“Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids.”** crc press, boca Ranton, Florida. 28, 50-62, 2004.
- Gomes, AF, Magalhães, KG, Rodrigues, RM, de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, PT, e Barbosa, HS. **A interação entre células do músculo esquelético do gôndii e toxoplasma aumenta a biogênese das gotículas lipídicas e modula positivamente a produção de IL-12, IFN-g e PGE 2.** Parasitas e vetores , 7 (1), 47, 2014.
- Mangino J E, kotadia B, Mangino M J. **“Characterization of Hypothermic intestinal Ischemia-reperfusion injury in dogs. Effects of glycine”.** Transplantation. 173, 62-78, 1996.
- Martin C, Butelli E, Petroni K, Tonelli C. **“How can research on plants contribute to promoting human health?”** Plant cell 23, 1685–1699, 2011.
- Matsuura H, Fukuhara K, **Vibrational Spectroscopic Studies of Conformation of Poly (oxyethylene).** 11. **conformation-spectrum correlations.** J. Polym. Sci. B 24, 1383–1400, 1986.

- Mauriz B, Matilla J, Culebras M, González P, González-Gallego J. **Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat.** Free Radical Biol Med. 31, 1236-1244, 2001.
- Mccole D F. **“The epithelial glycine transporter glyt1: protecting the gut from inflammation”.** J physiol 588, 1033–1034, 2010.
- Mccord J M. **The evolution of free radicals and oxidative stress.** Am J Med. 108, 652-659, 2000.
- Meyer K F, Martins J L, Filho L G F, Oliva M L V, Patrício F R S, Macedo M, Wang L. **“Glycine reduces tissue lipid peroxidation in hypoxia-reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in rats”.** Acta cirúrgica brasileira. 21, 161-170, 2006.
- Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Methods 65, 55–63, 1983.
- Muniz-Junqueira M I e Tosta C E. **Stages of in vitro phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by human monocytes.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42, 103-106, 2009.
- Nandita G Das e Sudip K. Das. **Controlled-Release of Oral Dosage Forms.** Formulation, Fill & Finish, 15, 10-17, 2003.
- Nelson D L, Cox M M. **Lehninger principles of biochemistry**, 3ª ed. New York: worth publishers, 2000.
- Oeckinghaus A, Hayden M S, Ghosh S. **Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways,** Nat. Immunol. 12, 695-708, 2011.
- Okur A C, Erkoc P, Kizilel S. **Targeting cancer cells via tumor-homing peptide CREKA functional PEG nanoparticles.** Colloids Surf. B 147, 191-200, 2016.
- Oliveira C M B, Sakata R K, Issy A M, Gerola L R, Salomão R. **Citocinas e Dor.** Rev Bras Anesthesiol 61, 255-265, 2011.
- Oliveira Júnior J O, Portella Junior C S A, Cohen C P. **Inflammatory mediators of neuropathic pain.** Rev Dor. São Paulo, 17, S35-42, 2016.
- Ozório M S, Souza Filho M P, Alves N, Job A E. **“Promovendo a conscientização ambiental: resultados de uma pesquisa realizada com alunos do ensino médio sobre polímeros, plásticos e processos de reciclagem”.** Rev bea, São Paulo, 10, 11-24, 2015.

- Parameswari A, Premkumar S, Premkumar R, Benial A M F. **Surface enhanced Raman spectroscopy and quantum chemical studies on glycine single crystal** J. Mol. Struct. 1116, 180–187, 2016.
- Park S J e kim S H. “**Preparation and characterization of biodegradable poly (lactide)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique**”. J colloid interface. 271, 336-341, 2004.
- Passos M F, Fernández-Gutiérrez M, Vázquez-Lasa B, Román J S, Maciel R. **PHEMA-PLLA semi-interpenetrating polymer networks: A study of their swelling kinetics, mechanical properties and cellular behavior**. Eur. Polym J. 85, 150–163, 2016.
- Pasut G. **Protein, peptide and nonpeptide drug PEGylation for therapeutic application: a review**. Exp. Op. Ther. Patents 14, 859–894 2004.
- Paz-Filho, G., Mastronardi, C., Franco, C. B., Wang, K. B., Wong, M. L., & Licinio, J.. **Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 56(9), 597-607, 2012.
- Paz M C, Santos M F A L, Santos C M B, Da Silva S W, Souza L B, Lima E C D, Silva R C, Lucci C M, Morais P C, Azevedo R B, Lacava Z G M. “**Anti-cea loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal Cancer**” International Journal Of nanomedicine: 7, 5271–5282, 2012.
- Pearson K and Whiteley M A. **Data for the problem of evolution in man, I: A first study of the variability and correlation of the hand**. Proceedings of the Royal Society of London, Vol. LXV, 1899.
- Pérez, R., & Labanda, J. **Estudio preliminar de la permeación de biomoléculas en membranas de nanofiltración**. Revista Iberoamericana de Polímeros, 14, 7, 2013.
- Pires C V, Oliveira M G A, Rosa J C, Costa N M B. **Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources**. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, 26, 179-187, 2006.
- Podstawka E, Ozaki Y, Proniewicz L M. Part I: **Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation of amino acids and their homodipeptides adsorbed on colloidal silver**. Appl. Spectrosc. 58, 570–580, 2004.
- Pompella A. **Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation**. International Journal of Vitamin and Nutrition Research, Bern, 67, 289-297, 1997.
- Protti, G. G., Gagliardi, R. J., Forte, W. C., & Sprovieri, S. R. S. **Interleukin-10 may protect against progressing injury during the acute phase of ischemic stroke**. Arquivos de neuro-psiquiatria, 71(11), 846-851, 2013.

- Qiu Jin-Feng, Gao X, Wang B L, Wei X W, Gou M L, Men K, Liu X Y, Guo G, Qian Z Y, Huang M J. **"Preparation and characterization of monomethoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) micelles for the solubilization and in vivo delivery of luteolin."** International Journal of nanomedicine 8, 3061-3069, 2013.
- Razak M A, Begum P S, Viswanath B, Rajagopal S. **Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, glycine: a review.** Oxid. Med. Cell Longev. 1, 1 -9, 2017.
- Reeds P J, Burrin D G, Davis T A, Fiorotto M L, Goudoever S B J B V. **"Protein nutrition of the neonate"** Proc. Nutr soc. 59, 87-97, 2007.
- Robbins e Cotran, Abbas, A k. Vinay, k. Fausto, N. **"Patologia - bases patológicas das doenças"** Em Patologia - bases patológicas das doenças, por Abbas Ak, Vinay k, Fausto N. Robbins e Cotran, - Elsevier/saraiva, 8ª ed. 2010.
- Rosado MT, Leonor M, Duarte TS, Fausto R. **Vibrational spectra of acid and alkaline glycine salts.** Vib. Spectrosc. 16, 35–54, 1998.
- Ruan G, Feng S S. **Preparation and characterization of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel.** Biomaterials. 24, 5037-44, 2003.
- Salvador U. **Química orgânica 3.** 1ª edição, vol 3. Editora saraiva p 39, 2000.
- Santos C M B, Da Silva S W, Saldanha C A, Almeida Santos M F M, Garcia M P, Azevedo R B and Morais P C. **"Sers as a valuable tool for detection and treatment follow-up of fungal infection in mice lungs: use of amphotericin b and its nanoencapsulation onto magnetic nanoparticles"** J. Raman spectrosc. 4259, 2013.
- Sakaguchi S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** Nature Immunology. 6:345-352, 2005.
- Scheppach W. **"Treatment of distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. A placebo controlled trial"**. Dig dis sci 1, 2254, 1996.
- Scott E A, Nichols M D, kuntz-Willits R, Elbert D L. **"Modular scaffolds assembled around living cells using poly(ethylene glycol) microspheres with macroporation via a non-cytotoxic porogen"** Acta biomat. 6, 29–38, 2010.
- Siegel R, Agranoff B, Albers R W, Molinoff P. **"Basic neurochemistry – molecular, cellular and medical Aspects."** Raven press, 4ª ed. 1989.

Smith B R, Gambhir S S. **Nanomaterials for In Vivo Imaging**. Chem. Rev. 117, 901-986, 2017.

Sommer C, White F - **Cytokines, Chemokines, and Pain**, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F– Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 279-302, 2010.

Souren P, Sun CK. “**Natural Polyamine inhibits mouse skin inflammation and macrophage activation**” *inflamm. Res.* 62, 681–688, 2013.

Sousa Sá O M. **Efeitos da glicina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamster. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina**. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2010.

Spittler A, Reissner C M, Oehler R, Gornikiewicz A, Gruenberger T, Manhart N, Brodowcz T, Mittlboeck M, Boltz-Nitulescu G, Roth E. **Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF- α production and accelerated IL-10 expression**. *FASEB J.* 13, 563–571, 1999.

Takahashi Y, Tadokoro H, **Structural studies of polyethers $-(\text{CH}_2)_m\text{-O}$ n. X. Crystal structure of Poly(ethylene oxide)**. *Macromolecules* 6, 672–675, 1973.

Tassinari S, Azuero A, Arreaza D, Rueda-Rodríguez M C, Castañeda-Cardona C, Rosselli D. **Dietary supplements as modifiers of cardiovascular risk in components of the metabolic syndrome in adults**. *Revista Colombiana de Cardiología* 24, 277-285, 2017.

Tsune I, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Takei Y, And Sato N. **Dietary Glycine Prevents Chemical-Induced Experimental Colitis In The Rat**. *Gastroenterology.* 125, 775 – 785, 2003.

U.S. **Food and Drug Administration, Medical Devices**, USA, <https://www.fda.gov>, 2018 (accessed 30 January 2018).

Veloso A B, Longo J P F, Muehlmann L A, Tollstadius B F, Souza P E N, Azevedo R B, Morais P C, da Silva S W. **SERS Investigation of Cancer Cells Treated with PDT: Quantification of Cell Survival and Follow-up**. *Sci. Rep.* 7, 7175-7175, 2017.

Villanova J C O, Oréfice R L e Cunha A S. “**Aplicações farmacêuticas de polímeros**”. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, 1-20, 2010.

Vinay k, Abbas A k, Nelson F, Robbins e Cotran. “**Patologia: bases patológicas das doenças**”. Elsevier 7 ed. [s.l.] Isbn 85-352-1391-0, 1504 p, 2005.

- Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, Marino M. **“Nutritional Flavonoids Modulate Estrogen Receptor alfa Signaling”**. IUBMB Life, 56, 145–151, 2004.
- Wang L, Hou Y, Yi D. **“Beneficial roles of dietary oleum cinnamomi in alleviating intestinal Injury”**. Frontiers in bioscience-landmark 20, 814-828, 2015.
- Wang W, Wu Z, Dai Z, Yang Y, Wang J, Wu G. **Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health**. Amino Acids 45, 463–477, 2013.
- Weeler M D, Ikejema K, Enomoto N, Stacklewitz F, Seabra V, Zhong Z, Bradford B, Thurman R G. **Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient**. Cell Mol Life Sci 56, 843-856, 2009.
- Wu G. **Functional amino acids in growth, reproduction, and health**. Adv. Nutr. 1, 31–37, 2010.
- Yamini D, Venkatasubbu G D, Kuma J, Ramakrishnan V, **Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles**. Spectrochimica Acta Part A 117, 299–303, 2014.
- Yin M, Zhong Z, Connor HD, Bunzendahl HWF, RusynI, Li X, Raleigh JA, Mason RP, Thurman RG. **“Protective effect of glycine on Renal injury induced by ischemia- reperfusion in vivo”**. Am j physiol renal Physiol. 282, 417 -423, 2002.
- Zanetti B G, Soldi V and Lemos-Senna E. **Effect of polyethylene glycols addition in microsphere formulations of cellulose acetate butyrate on efficacy carbamazepine and particles morphology encapsulation**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.38, 229–236, 2002.
- Zee V D, Marten V D B, Willem J e Holten-Neelen J C. **“The beta-human chorionic gonadotropin-related peptide LQGV exerts anti-inflammatory effects through activation of the adrenal Gland and glucocorticoid receptor in c57bl/6 mice”**. Journal of immunology 185, 5066-5073, 2010.
- Zhang J M, An J – **Cytokines, inflammation, and pain**. Int Anesthesiol Clin 45, 27-37, 2007.
- Zhong Z, Arteel G E, Connor H D, Yin M, Frankenberg M V, Stachlewitz R F, Raleigh J A, Mason R P, Thurman R G. **“Cyclosporin a increase hypoxia and free radical production in rat kidney: Prevention by dietary glycine”**. Am j physiol. 275, 595-604, 1998.
- Zhong Z, Wheeler M D, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Radford B, Lemasters J J. **“L-glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent”**. Curr opin clin nutr metab care. 6, 229-240, 2003.

Zrimsek A B, Henry A I, Van Duyne R P. **Single molecule surface-enhanced raman spectroscopy without nanogaps.** J. Phys. Chem. Lett. 4, 3206–3210, 2013.

ANEXOS

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/07



TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA DE PROJETO DE PÉSQUISA

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo N°354/CEP-HUJM/07

- "COM PENDÊNCIAS"
- APROVADO "ad referendum"
- APROVAÇÃO FINAL
- NÃO APROVADO

O projeto de pesquisa intitulado: "Atividade Funcional de Fagócitos do Colostro e Leite Humanos: Análise Cronobiológica," encaminhado pelo (a) pesquisador (a) Adenilda Cristina Honório França foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 13/06/07 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 13 de junho de 2007.


Profa. Dra. Maria Aparecida Munhoz Gaiva
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Hospital Universitário Júlio Müller
Rua L, SN, Jardim Alvorada, CEP 78048-790 Cuiabá - MT, Brasil
Fone: 65-3615-7254 e-mail: cep@ujm@cod.ufmt.br
http://www.ufmt.br/cep_hujm



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc

Full Length Article

Fabrication and characterization of glycine-loaded PEG nanoparticles for drug delivering: A comprehensive SERS study

Paulo C. Leventi Guimarães^{a,c}, Jaqueline Rodrigues da Silva^a, Ricardo Bentes de Azevedo^a, Paulo Cesar Morais^{b,d}, Sebastião William da Silva^{b,*}

^a Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília DF 71.910-900, Brazil

^b Institute of Physics, University of Brasília, Brasília DF 71.910-900, Brazil

^c Federal Institute of Mato Grosso, Barra do Garça MT 78.600-000, Brazil

^d School of Chemistry and Chemical Engineering, Anhui University, Hefei 230601, China



ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2018

Revised 26 March 2018

Accepted 23 April 2018

Available online 24 April 2018

Keywords:

Surface enhanced Raman scattering

Glycine

PEG nanoparticles

Drug delivery

ABSTRACT

This study reports on the successful preparation and characterization of a biocompatible colloidal suspension comprising glycine (Gly) loaded into polyethylene glycol (PEG) nanoparticles (Gly@PEG/NPs) and suspended within PBS. The interaction between the Gly molecule and the PEG nanoparticles is herein investigated using normal Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), the latter employing silver substrate. Additionally, scanning and transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering, zeta-potential, and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were employed to support our analyses. Morphological analyzes revealed that Gly@PEG/NPs have non-spherical shape with average diameter (polydispersion index) of 54.3 nm (0.16). Moreover, high-resolution TEM images demonstrated the coexistence of crystalline and amorphous phases in the Gly@PEG/NPs structure. The FTIR, normal Raman and SERS spectra strongly suggest that the protonated amino groups (NH_3^+) of the Gly molecules bind to the oxygen atoms of the PEG molecule by means of hydrogen bonds, leaving the carboxylate groups (COO^-) facing outwards to the bulk aqueous-like medium. Finally, MTT assay demonstrated that Gly@PEG/NPs are very much biocompatible at Gly concentrations of up to 1.0 mol/L while free Gly shows toxicity in the same range.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glycine (Gly) is the simplest possible amino acid, which can be dispersed into both hydrophilic and hydrophobic environments, with well-known modulatory effects on neurotransmission in the central nervous system (CNS) [1]. In addition, Gly has anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective effects [2]. As a result, Gly plays a key role in improving health while supporting the growth and well-being of mammals, particularly humans. As Gly is synthesized by the organism itself, it is treated as being nutritionally non-essential. However, some studies claim that the amount of Gly produced in vivo in some mammals (including humans) is not enough for regular metabolic activity [3,4]. Therefore, it has been shown that shortage of Gly index may lead to failure of immune response, undergrowth profile, abnormal nutrient metabolism, and many undesirable effects on human health [2,5]. Moreover, supplementation with Gly is mandatory in many cases and high-oral doses of Gly have been used as adjuvant in

schizophrenia treatment so as to enhance glutamate neurotransmission while mitigating glutamate system hypofunction thought to contribute to the disorder [6]. Generally, in these cases Gly is administered by simple solubilization of the amino acid in aqueous-based medium [7]. Appropriate doses of supplemental Gly are generally safe for mammals [4]. However, like all other nutrients, Gly overdose can cause amino acid imbalances and toxicity [3], which can lead to death [8,9]. Therefore, caution should be in place while prescribing dietary supplementation of Gly for mammals in general. Taking this into account, the search for new forms of Gly administration and delivery is an open avenue for innovation.

Development of nanomaterials for biomedical applications has been one of the major topics in nanotechnology in recent years [10,11]. Given the variety of biological processes occurring at the nanometer scale, the physicochemical properties engineered nanomaterials make them excellent candidates for biomedical applications at cell and sub-cell levels, providing revolutionary approaches for diagnosis, prevention and treatment of a wide pallet of diseases [12–15]. Recent advances in colloid technology,

* Corresponding author.

Polyethyleneglycol nanoparticles adsorbed to glycine as a bioengineered neomaterial for application in inflammatory processes

Paulo Celso Leventi Guimarães¹, Eduardo Luzia França², Adenilda Cristina Honório rança², Ricardo Bentes de Azevedo³, Paulo Cesar Morais⁴, Sebastião William da Silva⁴

¹Federal Institute of Mato Grosso, Barra do Garça MT, Brazil -Email: paulo.leventi@bag.iftmt.edu.br

²Institute of Biological and Health Science, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil
Email: adenildaehf@gmail.com; dr.eduardo.franca@gmail.com

³Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília DF 71.910-900, Brazil – Email:rasevedo@unb.br

⁴Institute of Physics, University of Brasília, Brasília DF 71.910-900, Brazil - wsilva@unb.br

Abstract— Polyethylene glycol nanoparticles (NP-PEG) have good adsorption in bioactive compounds and are considered promising vehicles. Several studies have reported the importance of the amino acid for several treatments, among them glycine that has immunomodulatory, cytoprotective and anti-inflammatory effects. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the synthesis of polyethylene glycol (PEG) nanoparticles adsorbed with glycine (NANO-PEG/GLY) on functional activity of colostrum macrophages. Human colostrum cells were obtained from 18 clinically healthy women and used for bioassays of cell viability, phagocytosis, microbicidal activity and cytokines concentration. It was observed that the cell viability index in the presence of NANO-PEG/GLY was above 83%. Phagocytosis rates in colostrum cells treated with glycine and in the presence of EPEC, whereas the highest microbicidal index were observed in macrophages treated with PEG-NANO-GLY. IL-1 β and TNF- α levels increased in GLY and NANO-PEG/GLY groups. The levels of IL-12 and IL-17 also increased in the macrophages cultures under the NANO-PEG/GLY treatment. In the supernatant cell culture IL-8 and IFN- γ levels were similar among the treatments. The data suggest that NANO-PEG particles produced were able to adsorb the amino acid glycine, and this new bioengineered material is capable of modulating the functional activity of human colostrum macrophages and represents an alternative route for the treatment of inflammatory diseases.

Keywords— Colostrum, Glycine, Inflammation, Macrophages, Polyethylene glycol.

I. INTRODUCTION

The inflammatory processes are part various pathologies which involves leukocyte infiltration, enzymes release and formation of free radicals derived from oxygen [1,2]. Macrophages are cells important in the regulation of the immune response during the inflammation [3]. Some works have reported that colostrum presents soluble immunological components and contains large amounts of viable leukocytes, especially macrophages [4]. On the other hand, other studies have revealed that many nutrients and metabolites provided by food exert an antioxidant effect, useful in protecting human health, preventing diseases [5,6]. There are some amino acids, such as glycine, which is being used in the treatment of patients suffering from enterocolitis because they have cytoprotective and anti-inflammatory action [7,8,9,10]. Glycine is a simple, non-essential amino acid known as a functional supplement used in the pharmaceutical industry, nutritional supplementation [10] and is bioactive compounds with anti-inflammatory activity present in colostrum [11,12,13]. Previous work showed that the adsorption of glycine onto Polyethylene glycol (PEG) microsphere was able to stimulate the colostrum macrophages and suggest that the controlled delivery system of glycine may be an additional mechanism of protection and treatment of patients with infections and/or inflammation gastrointestinal, as well as for the functioning of colostrum cells [7]. Considering that the PEG is a biodegradable and biocompatible component [14] and that this particles have the capacity not to be recognized by the immune system, circulate for longer periods in the body [15,16,17]] and has the ability to adsorb organic compounds, it is possible that this carrier of biological components to be used in the treatment of