

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
CAMPUS URUGUAIANA**

**TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO: EFEITOS DE
NANOCÁPSULAS COM DIFERENTES REVESTIMENTOS
POLIMÉRICOS E NANOCÁPSULAS DE COLCHICINA EM
*Drosophila melanogaster***

TESE DE DOUTORADO

FRANCIÉLE ROMERO MACHADO BALOK

URUGUAIANA, RS, BRASIL

2023

**TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO: EFEITOS DE NANOCÁPSULAS COM
DIFERENTES REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS E NANOCÁPSULAS DE
COLCHICINA EM *Drosophila melanogaster***

FRANCIÉLE ROMERO MACHADO BALOK

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Silvana Peterini Boeira

Coorientadora: Dra. Stéfani Machado Araujo
Borstmann

URUGUAIANA, RS, BRASIL

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

B195t Balok, Franciéle Romero Machado
Toxicidade e estresse oxidativo: Efeitos de nanocápsulas
com diferentes revestimentos poliméricos e nanocápsulas de
colchicina em *Drosophila melanogaster* / Franciéle Romero
Machado Balok.
128 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2023.
"Orientação: Silvana Peterini Boeira".

1. Nanoencapsulação. 2. *Drosophila*. 3. Toxicidade. I.
Título.

FRANCIÉLE ROMERO MACHADO BALOK

**TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO: EFEITOS DE NANOCÁPSULAS COM
DIFERENTES REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS E NANOCÁPSULAS DE
COLCHICINA EM *Drosophila melanogaster***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Tese de Doutorado defendida e aprovada em: 07 de agosto de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Silvana Peterini Boeira
Orientadora
UNIPAMPA

Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila
UNIPAMPA

Prof. Dra. Dalila Moter Benvegnú
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Prof. Dra. Ana Flávia Furian
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Hecson Jesser Segat
UNIPAMPA

Dedico esse trabalho a minha mãe Cleudir, meu pai Nelton e ao meu esposo Fabrício. Foram pessoas que me deram muito amor e incentivo para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Primero agradeço a Deus por ser sempre minha força e luz nos momentos de cansaço, me fortalecendo em cada passo rumo a conclusão desse sonho.

A minha família, em especial aos meus pais Cleudir e Nelton pelo seu amor, além de sempre me incentivarem a prosseguir estudando e torcendo por cada conquista pessoal e acadêmica.

Ao meu esposo Fabrício pelo seu amor, amizade e compreensão. Sempre acreditando no meu potencial, sonhando comigo e me motivando em cada importante etapa.

A minha orientadora Dra. Professora Silvana Peterini Boeira pelos seus ensinamentos desde a graduação até a conclusão do doutorado. É aquela pessoa sempre disponível para solucionar cada dúvida, mas também agradeço seu carinho e confiança em minha pesquisa.

A minha coorientadora Dra. Professora Stifani Machado Araujo Borstmann por todo o carinho da sua amizade e os ensinamentos teóricos ou laboratoriais. Obrigada também pela confiança e por cada palavra de motivação.

Aos membros do LAFTAMBIO pela convivência, auxílio durante a execução dos protocolos experimentais e análises, mas principalmente as lindas amizades que ali fizemos. Sentirei saudades de nossas rotinas mesmo que exaustivas, mas bastante divertidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade de prosseguir meus estudos e progredir profissionalmente.

Aos professores que fizeram parte durante meu doutorado, seja durante as aulas ou no laboratório, os quais são fontes de inspiração ao meu crescimento profissional.

A CAPES pelo fomento a ciência, seja pelo financiamento na condução dos experimentos e pela bolsa de doutorado, permitindo dedicação exclusiva a pesquisa.

RESUMO

Na nanotecnologia são empregados revestimentos poliméricos na formulação de nanocápsulas (NCs) poliméricas, dentre as quais NCs revestidas com Polissorbato 80 (NCP80), Polietilenoglicol (NCPEG), Quitosana (NCCS) e Eudragit (NCEUD). Para a aquisição de um fármaco nanoencapsulado são utilizados revestimentos poliméricos de acordo com o perfil de liberação e as características químicas da substância. Dentre os medicamentos com potencial para nanoencapsulação visando o tratamento de patologias, a colchicina é caracterizada pela sua propriedade anti-inflamatória. Associando a colchicina ao processo de nanoencapsulação espera-se otimizar a taxa terapêutica e minimizar os efeitos adversos. Até o momento pouco foi descrito sobre o perfil toxicológico desses nanomateriais, por isso objetivou-se comparar os efeitos da exposição a diferentes revestimentos poliméricos, colchicina livre (COL) e nanocápsulas de colchicina (NCCOL) sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*. Inicialmente investigou-se a exposição crônica a 10, 50, 100 e 500 µL de NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD. Posteriormente moscas foram expostas de forma aguda (48 horas) e crônica (10 dias) aos grupos: Controle, 0,001, 0,0025, 0,005 e 0,010 mg/mL de COL ou NCCOL. Ao decorrer dos experimentos contabilizou-se a taxa de sobrevivência, sendo mensurada a produção de espécies reativas (RS), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE), viabilidade celular e locomoção com o teste de campo aberto. Já nos revestimentos poliméricos incluiu-se o teste de geotaxia negativa. Exclusivamente para a COL e NCCOL avaliou-se a concentração letal média (LC50), tióis proteicos e não proteicos. Nos testes com os revestimentos poliméricos, todos causaram alta mortalidade na exposição a 500 µL. Somente a NCP80 (500 µL) alterou o tempo de escalada na geotaxia negativa e os níveis de TBARS, com número significativo de mortalidade a partir de 100 µL. A NCPEG (500 µL) elevou a atividade da CAT e da GST, e NCCS (500 µL) foi a única a modular a AChE. Por fim, tanto NCCS e NCEUD reduziram a atividade enzimática da CAT e SOD, com NCEUD a partir de 100 µL resultando em danos acentuados na exposição crônica. Encontrou-se na exposição aguda a COL menor número de cruzamentos no campo aberto e maior atividade da CAT. Enquanto NCCOL reduziu os níveis de RS, porém causou lipoperoxidação e atividade aumentada da SOD. Já a exposição crônica a COL e NCCOL resultou em elevada mortalidade com menor atividade enzimática da CAT e AChE, mas somente COL ocasionou menor número de cruzamentos no campo aberto,

relacionando ao dano locomotor. De forma positiva, NCCOL minimizou a produção de RS, enquanto COL elevou esse parâmetro. Foram fornecidas evidências da toxicologia das NCs poliméricas, demonstrando aspectos de nanosseguurança em futuras nanoformulações. Já no estudo comparativo, NCCOL afetaram em menor proporção o sistema antioxidante comparado a COL, embora seja exigida cautela porque a nanoencapsulação implica em maior biodisponibilidade. Por fim, um dos mecanismos de toxicidade propostos desses produtos da nanotecnologia sugerem o envolvimento do estresse oxidativo. Estudos futuros podem esclarecer o papel de outros mediadores biológicos nessa série de eventos ao sistema antioxidante.

Palavras-chave: Nanoencapsulação; *Drosophila*; Toxicidade.

ABSTRACT

In nanotechnology, polymeric coatings are used in the formulation of polymeric nanocapsules (NCs), including NCs coated with Polysorbate 80 (NCP80), polyethylene glycol (NCPEG), Chitosan (NCCS) and Eudragit (NCEUD). For the acquisition of a nanoencapsulated drug, polymeric coatings are used according to the release profile and chemical characteristics of the substance. Among the drugs with the potential for nanoencapsulation to treat pathologies, colchicine is characterized by its anti-inflammatory properties. Associating colchicine with the nanoencapsulation process is expected to optimize the therapeutic rate and minimize adverse effects. So far, little has been described about the toxicological profile of these nanomaterials, so the aim was to compare the effects of exposure to different polymeric coatings, free colchicine (COL) and colchicine nanocapsules (NCCOL) on behavioral parameters and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. Initially, chronic exposure to 10, 50, 100 and 500 μ L of NCP80, NCPEG, NCCS and NCEUD was investigated. Subsequently, the flies were exposed acutely (48 hours) and chronically (10 days) to the groups: Control, 0.001, 0.0025, 0.005 and 0.010 mg/mL of COL or NCCOL. During the experiments, the survival rate was recorded, measuring the production of reactive species (RS), substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), enzymatic activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE), cell viability and locomotion with the open field test. For polymeric coatings, the negative geotaxis test is included. Exclusively for COL and NCCOL, the mean lethal concentration (LC₅₀), protein and non-protein thiols was evaluated. In tests with polymeric coatings all caused high mortality at 500 μ L exposure. Only NCP80 (500 μ L) altered the climbing time in negative geotaxis and TBARS levels, with a significant number of deaths from 100 μ L onwards. NCPEG (500 μ L) increased CAT and GST activity, and NCCS (500 μ L) was the only one to modulate AChE. Ultimately, both NCCS and NCEUD reduced the enzymatic activity of CAT and SOD, with NCEUD from 100 μ L resulting in marked damage on chronic exposure. A lower number of crosses in the open field and higher CAT activity were found in acute exposure to COL. While NCCOL reduced RS levels, however caused lipid peroxidation and increased SOD activity. Chronic exposure to COL and NCCOL resulted in high mortality with lower enzymatic activity of CAT and AChE, but only COL caused a lower number of crosses in the open field, relating to locomotor damage. Positively, NCCOL minimized RS production, while COL increased this parameter. Evidence of the toxicology of polymeric NCs was provided, demonstrating

nanosafety aspects in future nanoformulations. In the comparative study, NCCOL affected the antioxidant system to a lesser extent compared to COL, although caution is required because nanoencapsulation implies greater bioavailability. Finally, one of the proposed toxicity mechanisms of these nanotechnology products suggests the involvement of oxidative stress. Future studies may clarify the role of other biological mediators in this series of events to the antioxidant system.

Keywords: Nanoencapsulation; *Drosophila*; Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Escala em nanômetros.....	16
Figura 2- Representação da estrutura das nanopartículas poliméricas.....	18
Figura 3- Demonstração da eficácia das nanopartículas como veículos de entrega, altamente dependente do tamanho e da forma.....	20
Figura 4- Fórmula e estrutura química do PEG	24
Figura 5- Esquema com as reações químicas da quitosana.....	27
Figura 6- Liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas produzidas com polímeros Eudragit®.....	29
Figure 7- Requisitos para avaliação de risco para nanomateriais (NMs) de acordo com o REACH	31
Figura 8- Estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	34
Figura 9- Estrutura molecular da Colchicina	36
Figura 10- Características físico-químicas da Colchicina.	37
Figura 11- Colchicina inibe a polimerização da Tubulina.....	39
Figura 12- Nanoencapsulação da colchicina.....	43
Figura 13- Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	45
Figura 14- Demonstração das vias de administração de medicamentos no modelo <i>Drosophila melanogaster</i>	47
Figura 15- As espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS)	48
Figura 16- A exposição a Nanomateriais e sua relação com estresse oxidativo e toxicidade.....	51

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Nanotecnologia e sua aplicação na área farmacêutica	16
2.2 Nanocarreadores poliméricos	21
2.2.1 Polissorbato 80 (P80)	22
2.2.2 Polietilenoglicol (PEG)	24
2.2.3 Quitosana (CS)	26
2.2.4 Eudragit® RS100	28
2.3 Nanosseguurança	30
2.4 Covid-19 e patogênese	32
2.5 Colchicina	36
2.5.1 Metabolismo e mecanismo de ação da Colchicina	37
2.5.2 Aplicação terapêutica e recomendação de uso da colchicina	39
2.5.3 Colchicina e Inflamação	41
2.5.4 Utilização de Colchicina para tratamento da Covid-19	42
2.6 <i>Drosophila melanogaster</i>	44
2.6.1 A <i>Drosophila</i> e o estudo da Nanotoxicidade	46
2.7 Estresse oxidativo e sua relação com toxicidade	48
3.JUSTIFICATIVA	52
4. OBJETIVOS	53
4.1 Objetivo geral	53
4.2 Objetivos específicos	53
5.RESULTADOS	55
5.2 Manuscrito 1	56
5.2 Artigo científico 1	94
6. DISCUSSÃO GERAL	113

7. CONCLUSÃO.....	117
8. PERSPECTIVAS.....	118
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

APRESENTAÇÃO

Esta Tese é composta pelos seguintes tópicos: Introdução, Revisão Bibliográfica, Justificativa, Objetivos, Resultados, Discussão Geral, Conclusão e Referências Bibliográficas.

Os Resultados são apresentados sob a forma de 01 Manuscrito e 01 Artigo Científico. Cada um desses documentos consta com a Introdução, Metodologia, Resultados e Discussão, além das respectivas Referências. Cada manuscrito e artigo atende as normas próprias de formatação exigidas pelos periódicos, seja onde foi publicado ou, no caso do Manuscrito, ao periódico que será submetido.

Ao final dessa tese, constam as Referências Bibliográficas, as quais abrangem apenas as citações apresentadas ao decorrer da estrutura da Tese nos itens – Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão Geral. Para o manuscrito e artigo as suas Referências são apresentadas dentro de sua própria estrutura seguindo a formatação do periódico.

1.INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia é uma área bastante promissora para ampliar o potencial terapêutico de diversos fármacos, sendo descrito que o processo de nanoencapsulação apresenta como benefícios aumentar a biodisponibilidade permitindo que a substância apresente boa taxa terapêutica e minimize seus efeitos adversos (HANDFORD *et al.*, 2014; YUN *et al.*, 2013). Além disso, a nanoencapsulação objetiva proteger os medicamentos da degradação ao entrar em contato com os fluídos biológicos e facilitar a entrada no ambiente celular (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002).

Nessa área, para a aquisição de fármacos nanoencapsulados podem ser empregados revestimentos poliméricos na formulação de nanocápsulas (NCs) poliméricas. Entre os exemplos, as NCs podem revestidas com Polissorbato 80 (NCP80), Polietilenoglicol (NCPEG), Quitosana (NCCS), Eudragit (NCEUD) e outros polímeros. Nessa questão é fundamental incluir a avaliação desses revestimentos poliméricos extensamente utilizados na nanotecnologia e passíveis de causar respostas biológicas (PATIL *et al.*, 2009; D'SOUZA & SHEGOKAR, 2016; DUNCAN & GASPAR, 2011).

Além disso, dentro da proposta de nanoencapsulação de medicamentos utilizados na prática clínica para tratamento de doenças, a colchicina caracteriza-se pelas propriedades anti-inflamatórias (DINARELLO *et al.*, 1974). Nos últimos anos, devido aos atributos terapêuticos, essa substância tem recebido destaque em doenças relacionadas a processos inflamatórios, incluindo a Covid-19 e outras patologias (REYES *et al.*, 2021). Contudo é um medicamento com índice terapêutico estreito apresentando restrições quanto a posologia (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2005). A abordagem da nanotecnologia é necessária a fim de minimizar os efeitos adversos, pois na nanoencapsulação pode ser modificada a biodisponibilidade, perfil de liberação e as propriedades farmacocinéticas (FRANK *et al.*, 2014; (CHEN *et al.*, 2014).

Devido os acontecimentos na saúde mundial, o uso de fármacos com potencial anti-inflamatório usados previamente no tratamento de doenças são fundamentais para pesquisas a curto prazo, incluindo as doenças emergentes. Ao mesmo tempo a atuação anti-inflamatória da colchicina pode abranger um espectro maior de doenças. Assim antes de avaliar o potencial terapêutico, ressalta-se a importância de compreender em modelos alternativos como *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) o efeito toxicológico dos revestimentos poliméricos utilizados na formulação de nanocápsulas com fármacos, e da colchicina nanoencapsulada.

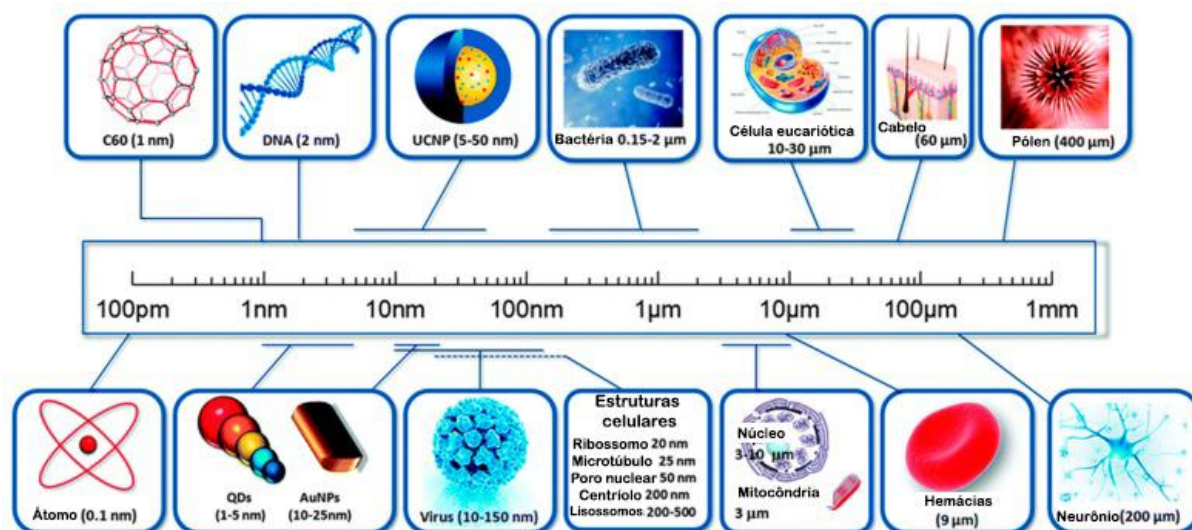
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nanotecnologia e sua aplicação na área farmacêutica

O desenvolvimento da nanociência é datado desde a época dos gregos e Demócrito no século V a.C, sendo o estudo de estruturas e moléculas na escala de nanômetros (nm). Em 1959 o renomado físico Richard Feynman discutiu a primeira definição para o termo nanotecnologia. Anos mais tarde, a nanotecnologia foi primeiramente usada por Norio Taniguchi em 1974, mas esse campo surgiu de fato na década de 1980 com as crescentes publicações científicas. A nanotecnologia trata-se de um campo multidisciplinar, cobrindo uma vasta gama de materiais e aplicações em áreas como ciências químicas, físicas, biológicas, eletrônicas e da engenharia (HANDFORD *et al.*, 2014). Torna-se importante destacar dois aspectos: a utilização de estruturas visando controlar a forma e tamanho em escala nanométrica e a busca de inovação para o proveito de propriedades próprias desses produtos em nanoescala.

Na figura 1 são exemplificadas a escala de nanômetros:

Figura 1- Escala em nanômetros



Fonte: BAYDA et al. (2019). Adaptada pela autora.

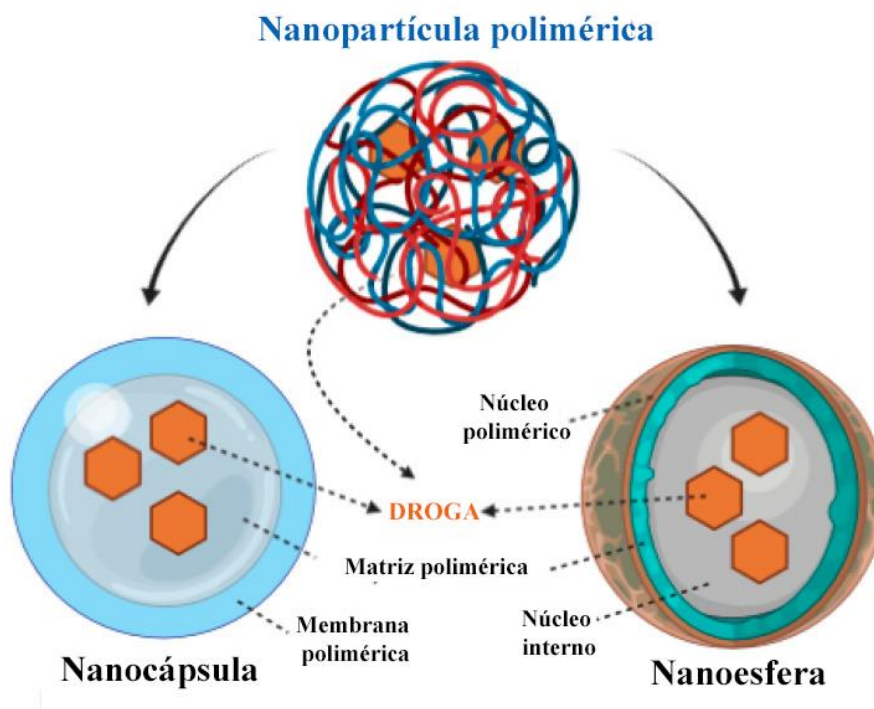
De forma geral, o campo nanotecnológico visa a fabricação, caracterização e experimento de compostos em nanoescala. Embora na literatura sejam descritas faixas até 100 nm, por exemplo, produtos como as nanopartículas poliméricas apresentam tamanhos superiores. Portanto, é correto afirmar que as faixas de nanoescala podem compreender tamanho de 1 a 1000 nm, abrangendo diversos produtos da nanotecnologia (ZIELIŃSKA *et al.*, 2020).

Na década de 2000 houve o aumento de pesquisas e a partir desse período, maior atenção política, científica e comercial causou progressos na área. Também a comercialização de produtos desses avanços tecnológicos passou a ser mais evidente ressaltando a nanotecnologia (HANDFORD *et al.*, 2014). Com os avanços buscou-se o melhoramento na estabilidade térmica, armazenamento, solubilidade em água e substâncias bioativas, maior biodisponibilidade para fins alimentares e a melhora de propriedades em macroescala dos alimentos (textura, sabor, coloração etc.) (SANTOS *et al.*, 2016).

Os diversos produtos da nanotecnologia apresentam especificidades quanto a sua composição, de acordo com a tecnologias empregadas em sua formulação. Por exemplo, a composição geral das nanopartículas geralmente consiste no revestimento com surfactantes não iônicos para minimizar as interações imunológicas e diminuir as interações moleculares dos grupos químicos na superfície dessa partícula. Dentre as interações destacam-se: van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Além disso, cabe destacar que o termo “nanopartícula” é o nome coletivo dado para as nanoesferas e nanocápsulas (FANF & BHANDARI, 2010).

Conceitualmente, as nanocápsulas apresentam uma membrana polimérica com um núcleo líquido. O composto ativo é confinado a uma cavidade contendo um núcleo líquido interno que tem em seu redor uma membrana polimérica (FANF & BHANDARI, 2010). Já as nanoesferas são fragmentos coloidais de estado sólido, sendo os compostos bioativos difusos, encapsulados, capturados e quimicamente envolvidos ou adsorvidos na matriz polimérica. Essa matriz de polímero é responsável por formar uma matriz sólida ou porosa, e a porção do núcleo provavelmente torna-se material sólido de acordo com a estrutura do copolímero (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Na figura 2 é ilustrada a estrutura de nanopartículas poliméricas:

Figura 2- Representação da estrutura das nanopartículas poliméricas.



Fonte: ZIELIŃSKA *et al.* (2020). Adaptada pela autora.

O comportamento físico-químico e farmacêutico pode ser influenciado, tanto pela sua dispersão quanto pelo tamanho das nanocápsulas, compondo um dos aspectos relevantes na nanoencapsulação. Após decorrida a síntese, a caracterização básica das nanopartículas considera diversos parâmetros como seu tamanho, índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (SANTOS *et al.*, 2016). Por exemplo o PDI é utilizado para descrever o grau de não uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas (DANAEI *et al.*, 2018). Enquanto o potencial Zeta trata-se de uma propriedade física que mede a carga elétrica de partículas em suspensão aquosa ou não. Exemplificando, quando as partículas apresentam cargas elétricas de mesma natureza, uma força elétrica de repulsão as mantém afastadas. Do contrário, se as partículas tiverem cargas elétricas de natureza oposta, em diferentes proporções, as forças elétricas de atração farão aparecer pequenos grumos ou flocos (MOHAMMADI-JAM *et al.*, 2022).

Até o atual momento, na área farmacológica uma série de produtos são utilizados na prática clínica. Na nanoencapsulação de pequenas moléculas/drogas são utilizados os chamados nanocarreadores, assim pelo uso de métodos modernos o carregamento de

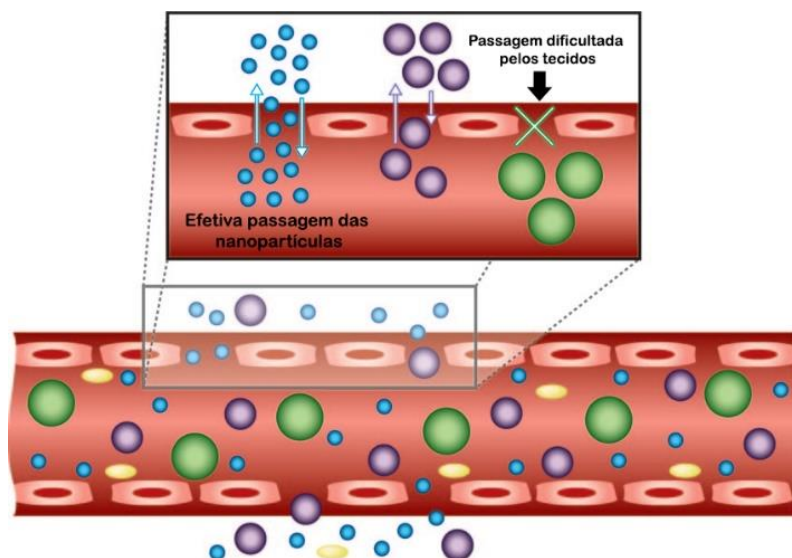
moléculas ocorre eficientemente dentro dos nanocarreadores. Desta forma, ocorre redução da toxicidade sistêmica associada aos fármacos e em alguns casos permite a acumulação do composto nanoencapsulado no local de seu efeito farmacológico. Especificamente, os nanocarreadores possuem muitas funções, destacando: aumento da biodisponibilidade, prolongada presença no sangue e maior captação pela célula (KUMARI *et al.*, 2014).

Quanto aos métodos de síntese, estes variam de acordo com a estrutura química da substância, aplicação e o período de retenção corporal esperado para o agente terapêutico. Outro fator que pode modular o mecanismo de liberação são os nanocarreadores usado na síntese, por exemplo, a absorção celular e penetração através das barreiras biológicas são importantes para determinar a sua distribuição e tamanho (KUMARI & YADAV, 2011). Já para os veículos de entrega alguns parâmetros devem ser incluídos como a utilização de materiais biocompatíveis, seguido da otimização de requisitos biofísico-químicos desses veículos de entrega de drogas considerando as propriedades farmacocinéticas e a absorção pelas células (PATIL *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008).

O uso da nanotecnologia como sistema de liberação de medicamentos (*do inglês “Drug delivery systems”*) tem como principais objetivos: liberação dos compostos farmacêuticos ativos de forma a atuar especificamente no local da droga em boa taxa terapêutica, controle do tamanho das partículas e das propriedades de superfície (YUN *et al.*, 2013). Dentre as vantagens destaca-se: melhor entrega de substâncias pouco solúveis em água; direcionamento na entrega de medicamentos de forma específica para células ou tecidos; transcitose de drogas através de barreiras epiteliais e endoteliais apertadas; entrega de substâncias de grandes macromoléculas para locais de ação intracelular e aumento da eficácia *in vivo* (FERRARI, 2005).

Ademais, objetiva proteger as drogas da degradação ao entrar em contato com os fluídos biológicos e facilitar a entrada celular, auxiliando moléculas hidrofóbicas com a rápida dissolução do composto (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). Na figura abaixo é demonstrado o tamanho e forma de nanopartículas, além de sua influência na passagem tecidual.

Figura 3- Demonstração da eficácia das nanopartículas como veículos de entrega, altamente dependente do tamanho e da forma.



Fonte: FAROKHZAD & LANGER (2009). Adaptada pela autora.

As nanopartículas podem ser descritas como sistemas coloidais submicrônicos (1 μ m), que são geralmente feitas de polímeros (biodegradáveis ou não). Quanto as dimensões, as nanopartículas poliméricas abrangem a faixa de diâmetro de até 1000 nm apresentando capacidade de encapsular, conjugar e adsorver materiais não nativos dentro dela ou superfícies (PRIDGEN; ALEXIS; FAROKHZAD, 2014).

Ainda, destaca-se que os sistemas de administração controlada de medicamentos têm várias vantagens como maior eficácia e redução da toxicidade. Dentre as vantagens das nanopartículas na administração oral na indústria farmacêutica, estão a maior estabilidade *in vivo* após a sua administração e maior estabilidade durante o armazenamento (YUN *et al.*, 2013).

As formas atuais de liberação de nanopartículas na mucosa oral empregam a utilização de polímeros bioadesivos. Esses polímeros visam aumentar a exposição às células intestinais para uma maior absorção. As nanopartículas poliméricas do tipo para administração na mucosa classificam-se como: nanopartículas ligadas a ligantes específicos, nanopartículas mucoadesivas e nanopartículas sensíveis ao pH. Ressalta-se que o polímero é responsável por modular as propriedades físico-químicas e de liberação de um fármaco (PRIDGEN; ALEXIS; FAROKHZAD, 2014). Portanto, de acordo com a nanotecnologia empregada e seu objetivo, são diversas aplicações e finalidades a serem destacadas nessa área que envolvem o uso de polímeros.

2.2 Nanocarreadores poliméricos

As nanopartículas poliméricas surgiram como um sistema de transporte versátil para a entrega direcionada de medicamentos de pequeno peso molecular e para agentes terapêuticos macromoleculares. A liberação lenta da molécula do fármaco e seu efeito terapêutico prolongado hoje em dia é possível graças ao uso de materiais poliméricos no processo de fabricação de nanopartículas (PATIL *et al.*, 2009). Diversas inovações em nanotecnologia podem surgir na entrega de fármacos, sendo que as tecnologias que utilizam polímeros de liberação controlada e lipossomas são relevantes clinicamente (FAROKHZAD & LANGER, 2009).

A utilização de polímeros apresenta importante papel em sistemas de liberação de medicamentos nos produtos farmacêuticos. Esses polímeros podem ser divididos em naturais e sintéticos, como por exemplo, derivados de celulose, amido, poliésteres, entre outros. Determinados polímeros biodegradáveis foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, dentre eles o polietilenoglicol (PEG), poli(L-láctico ácido) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL) e a metacrilamida (HPMA). Dentre as funções, destacam-se como estabilizadores, solubilizantes, controle de liberação, auxiliam intensificando a biodisponibilidade e como carreadores de fármacos (D'SOUZA & SHEGOKAR, 2016).

De acordo com Gregoriadis e colaboradores, na década de 1970 com o desenvolvimento de entrega por lipossomas, houve também o surgimento de novas tecnologias de entrega inovadoras na área de transportadores nanoparticulados à base de polímeros. Essas tecnologias incluem as nanopartículas poliméricas, dendrímeros, micelas poliméricas e as polimerossomas (DUNCAN & GASPAR, 2011). Posteriormente, em 1976 foi descrito o primeiro sistema de polímero de liberação controlada para a entrega de macromoléculas, sendo que também outros produtos orgânicos e biomateriais inorgânicos foram desenvolvidos para a liberação de substâncias (LANGER & FOLKMAN, 1975).

As nanocápsulas podem ter adição de diferentes polímeros visando sua modificação, o que resulta em hidrofilicidade / hidrofobicidade e carga superficial dos sistemas alteradas através de sua nova superfície. A partir dessa modificação, pode ser desencadeada uma interação e resposta biológica diferente para cada tipo de superfície utilizada (CHEN *et al.*, 2014). Os polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG)

são responsáveis por reduzir o reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear, o que torna o tempo de circulação mais longo (FRANK *et al.*, 2014). Enquanto os polímeros do tipo catiônico como Eudragit® RS100 (EUD) e quitosana (CS) possibilitam maior interação da droga com a membrana celular (CHEN *et al.*, 2014). Esses exemplos destacados acima são apenas alguns dos polímeros usados em nanotecnologia, os quais devem ser compreendidos quanto aos seus aspectos toxicológicos, devido a exposição cada vez mais frequente do ser humano as nanocápsulas. Os polímeros como P80, PEG, CS e EUD são extensamente aplicados na formulação de nanocápsulas como revestimentos.

2.2.1 Polissorbato 80 (P80)

Na fabricação de medicamentos, tanto na biotecnologia quanto farmacêutica, são vendidos como polissorbato 20 ou 80 ou seus nomes comerciais, respectivamente Tween 20 e Tween 80. O polissorbato 80 (P80) é quimicamente conhecido como monooleato de polioxietileno 20-sorbitano. Ambos os tipos de polissorbatos apresentam estrutura comum diferindo apenas entre as estruturas do ácido graxo laterais. Ainda, as cadeias de hidrocarbonetos fornecem a natureza hidrofóbica dos polissorbatos, enquanto subunidades de óxido de etileno designam a natureza hidrofílica (BRANDNER, 1998). Em geral a sua aplicação é o uso como estabilizante, surfactante e emulsificante encontrado na composição de cosméticos, alimentos, ampla variedade de medicamentos etc. (COORS *et al.*, 2005).

Trata-se de um composto sintético não iônico hidrofílico derivado a partir de óxido de etileno, sorbitol e ácido oleico (COORS *et al.*, 2005). Embora o principal componente seja o monooleato de polioxietileno-20-sorbitano, P80 está geralmente disponível como uma mistura de diferentes ésteres de ácidos graxos com o ácido oleico compreendendo > 58% da mistura. Essa é a principal composição de ácidos graxos, mas também podem estar presentes outros ácidos graxos como o palmítico ou linoleico. Já o seu peso molecular compreende 1309,7 Da e uma densidade de 1,064 g/mL (KERWIN, 2008).

Na estabilidade química alguns aspectos são importantes serem destacados. De acordo com KERWIN (2008), polissorbatos são conhecidos por sofrer auto-oxidação e clivagem nas subunidades de óxido de etileno. Além disso, também pode ocorrer a hidrólise de ligação éster do ácido graxo. Por exemplo, o processo de auto-oxidação do

óxido de etileno ocasiona a formação de hidroperóxidos, clivagem de cadeia lateral e, adicionalmente, a formação de ácidos graxos de cadeia curta como o ácido fórmico. Essa geração de hidroperóxidos pelo polissorbato é conhecida por resultar em oxidação de proteínas (KERWIN, 2008).

Na formulação de medicamentos pode ser adicionado como excipiente, sendo um tensoativo não iônico sintético. Por exemplo, na aplicação médica em produtos para tratamento oncológico e cuidados de suporte ou prevenção, são incluídos medicamentos como docetaxel, epoetina/darbepoetina e fosaprepitant que apresentam o P80 em sua formulação (COORS *et al.*, 2005). Em pesquisas na década de 90 já eram apontados aspectos na farmacologia, pois foram evidenciadas propriedades farmacodinâmicas desse polímero devido alterações na fluidez da membrana e aumento de sua permeabilidade.

Adentrando a área toxicológica dessa substância, dados anteriores reportam como um composto biologicamente e farmacologicamente ativo. Ao que parece, isso poderia consequentemente modificar as propriedades farmacológicas do medicamento com o qual é formulado ou mesmo mediar os eventos adversos. Mesmo com poucas evidências, o P80 já foi relacionado com reações adversas associadas a medicamentos formulados com este veículo. De acordo com ten TIJE *et al.* (2003) o P80 tem sido implicado em uma série de reações sistêmicas como a hipersensibilidade, anafilaxia não alérgica, erupção cutânea e ocorrência de eventos adversos no local da injeção e infusão. Também, foi demonstrado por ensaios de imunoabsorção enzimática que este pode ativar o sistema complemento, que é um mecanismo imunológico multiproteico. Com a ativação desse sistema podem ocorrer consequências como a fagocitose, estimulação e recrutamento de glóbulos brancos ou perfuração de membranas plasmáticas. Esses fatos deletérios podem ocasionar efeitos colaterais imunológicos, como hipersensibilidade aguda e reações imunes sistêmicas (WEISZHAR *et al.*, 2012). Enquanto no estresse oxidativo, o P80 em estudo *in vitro* com o peróxido de hidrogênio em timócitos de ratos elevou a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio na condição *in vitro*, levando a suscetibilidade maior ao estresse oxidativo. Outras evidências reportam, aplicação de P80 (30 µg/ml) juntamente com ZnCl₂ no aumento da letalidade celular, enquanto a viabilidade celular foi reduzida em elevadas concentrações 300 µg/ml em timócitos de rato (OYAMA *et al.*, 2010; HIRAMA *et al.*, 2004).

2.2.2 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol (PEG) é um poliéter composto de repetidas unidades de etilenoglicol $[-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n]$. A síntese desses polímeros de PEG pode ser obtida via polimerização aniônica de óxido de etileno e qualquer iniciador de hidroxila. Geralmente os PEGs comerciais estão disponíveis em diferentes graus de polimerização e grupos funcionais ativados. Inclusive, também denominados como oligômeros de óxido de polietileno, podem ser comercializados em uma faixa de peso molecular entre 200 a 10.000.000 g/mol. Enquanto os seus derivados podem apresentar variados pesos moleculares. Na Figura 4 é exemplificada quimicamente a PEG.

Figura 4- Fórmula e estrutura química do PEG.



Fonte: D'SOUZA & SHEGOKAR (2016). Adaptada pela autora.

Dentre os aspectos de PEG está sua alta polaridade, consequentemente elevando a hidrofiliabilidade e a solubilidade em água. Essa alta solubilidade do PEG pode ocorrer também com grande parte dos compostos orgânicos, como solventes inorgânicos (PASUT & VERONESE, 2012). Quanto ao estado físico, PEG pode ser encontrado desde líquido não volátil claro à temperatura ambiente (baixo peso molecular de 200-700 g/mol), estado semissólido (material pastoso, PEG médio com peso molecular de 800-2000 g/mol) e sólido (sólido ceroso branco com peso molecular de 3000 ou mais) (PHAM *et al.*, 2022). Ademais essa substância apresenta destaque pela sua alta flexibilidade estrutural, biocompatibilidade e uma alta capacidade de hidratação.

A partir da década de 1950, diversas aplicações com os PEGs foram difundidas, dentre elas como auxiliares de separação e purificação, anticongelantes, aditivos alimentares, veículos em aplicações dermatológicas, parenterais, pílulas e comprimidos. Posteriormente ao final dos anos 70, ABUCHOWSKI & DAVIS evidenciaram o conceito de “PEGuilação” para entrega de proteínas e drogas, sendo que em 1990 o primeiro conjugado “PEGuilado” surgiu. Essa formulação conhecida como Adagen® era prescrita

na doença de imunodeficiência obtendo sucesso clínico (ABUCHOWSKI *et al.*, 1977; D'SOUZA & SHEGOKAR *et al.*, 2016).

Atualmente, PEG é um polímero aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, o qual o Guia de Ingredientes Inativos classifica a utilização de PEGs em formulações orais, tópicas e intravenosas, além de descrever a concentração máxima de PEGs usados nessa composição (D'SOUZA & SHEGOKAR, 2016; van BALLEGOOIE *et al.*, 2022). PEG destacam-se no ambiente biológico pois são substâncias inertes com baixa adsorção de proteínas, adesão celular e com grau insignificante de inflamação (D'SOUZA & SHEGOKAR, 2016). Dentre outras características é um polímero hidrofílico (solúvel em água), não tóxico e não imunogênico (PHAM *et al.*, 2022; van BALLEGOOIE *et al.*, 2022).

Existe uma ampla utilização de PEGs em produtos como cosméticos e na indústria farmacêutica como na entrega medicamentosa. No campo das formulações farmacêuticas sua aplicação inclui as preparações parenterais, tópicas, oftálmicas, orais e retais, incluindo também os sistemas modernos de liberação de drogas (PHAM *et al.*, 2022). Resumidamente, servem como veículos para fármacos como bases de pomadas, comprimidos, cápsulas, entre outras formas de medicamentos. Além disso, PEG apresenta diversas aplicações como umectantes, emulsificantes e agentes de limpeza (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2005).

Já em relação a nanotecnologia, PEG demonstrou elevar o período de circulação para os lipossomas e as nanopartículas poliméricas em 1990 e 1994, respectivamente (GREF *et al.*, 1994). Esse maior período de circulação pode ser exemplificado no medicamento Doxil®, em que as cadeias de PEG foram covalentemente ligadas aos lipídios para prolongar a circulação sanguínea do fármaco doxorrubicina.

É relatado que a modificação de NPs por PEG favorecem a biocompatibilidade e o comportamento físico-químico, sendo que diferentes NPs podem ser modificadas por PEG, dentre as quais os lipossomas, dendrímeros, NPs metálicas e os polímeros sintéticos (van BALLEGOOIE *et al.*, 2022). Por exemplo, quando ocorre a incorporação de lipídeos conjugados com PEG em transportadores à base de lipídios, isso prolonga de forma substancial o tempo de vida da circulação de lipossomas. Acredita-se que os PEG-lipídeos minimizam as interações superfície-superfície, incluindo a agregação de lipossomas e/ou adsorção de proteínas plasmáticas (Dos SANTOS *et al.*, 2007). Como observado em Dos SANTOS *et al.* (2007), o principal papel do PEG é evitar as interações superfície-superfície que podem levar à agregação de partículas.

Segundo PATIL *et al.* (2009) é descrito que um maior período de nanopartículas na circulação sistêmica é possível pela funcionalização da superfície de nanopartículas com polímeros hidrofílicos como PEG. Além do Doxil®, na nanotecnologia o uso de PEGs pode ser encontrado em formulações de NPs a base de lipídeos como Onivyde® (van BALLEGOOIE *et al.*, 2022). Em nanopartículas permite melhor direcionamento e biodisponibilidade do fármaco. Contudo seu extenso uso deve ser criteriosamente avaliado em relação aos aspectos toxicológicos (D'SOUZA & SHEGOKAR, 2016).

Cabe ressaltar que PEG além de ser um componente de diversos produtos medicamentosos, também está presente em hidratantes, xampus, alimentos, creme dental e bebidas. Por isso, sempre importante compreender os aspectos desses polímeros de larga escala de aplicação.

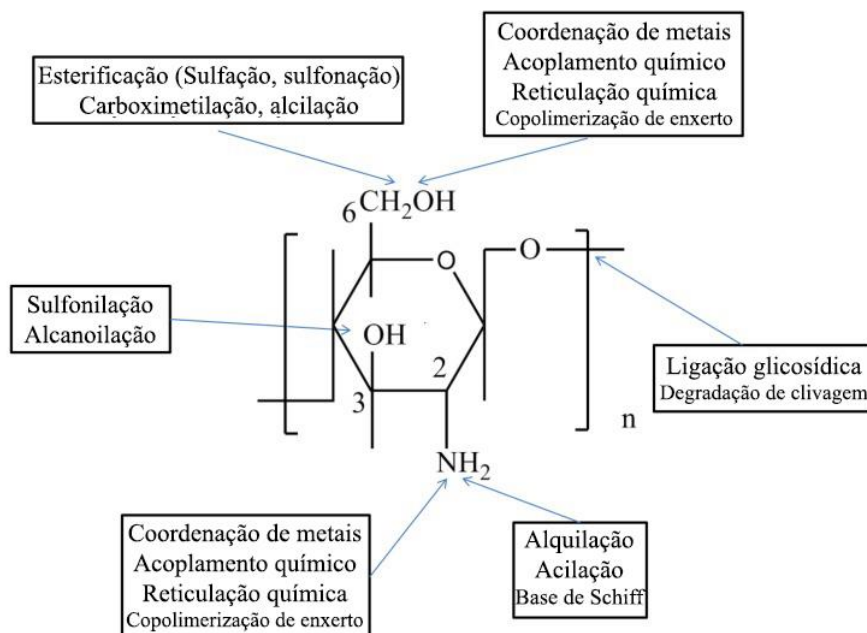
2.2.3 Quitosana (CS)

A quitosana é um polímero proveniente da desacetilação da quitina, encontrada em abundância na natureza. Entre os polissacarídeos mais abundantes, após a celulose e a hemicelulose está a quitosana, usada como revestimento na nanotecnologia devido sua característica biodegradável e não tóxica (HALDORAI *et al.*, 2015). Quimicamente os derivados da quitosana podem ser obtidos por modificação química de grupos funcionais reativos à quitosana. Assim, os grupos ativos $-OH$ e $-NH_2$ na molécula são propensas as reações químicas (RAZMI *et al.*, 2019). A quitosana é aprovada pela FDA, caracterizada pelas boas propriedades de adsorção e hidratação (WANG *et al.*, 2020). De acordo com XIA *et al.* (2015) o efeito de adsorção na mucosa pela quitosana ocorre por meio da atração eletrostática com as proteínas da mucosa, com a ligação de hidrogênio e com as propriedades hidrofóbicas. Enquanto os derivados de quitosana geralmente atingem essa adesão da mucosa através de pontes de hidrogênio ou interações não específicas, não covalentes e eletrostáticas (MAHMOOD *et al.*, 2017).

Contudo, dentre as desvantagens está a insolubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, limitando seu uso (RAZMI *et al.*, 2019). Conforme descrito, a insolubilidade limita a utilização da quitosana e ocorre devido as ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares. Existem três formas para melhorar a solubilidade da quitosana, dentre as quais: Desacetilação da quitina (quitosana após a desacetilação somente pode ser dissolvida em uma solução ácida) e modificação química (grupo hidrofílico é introduzido em um grupo amino ou um grupo hidroxila) (WANG *et al.*,

2020). Abaixo são descritas as reações químicas da quitosana, a fim de propor sua transformação química:

Figura 5- Esquema com as reações químicas da quitosana.



Fonte: WANG *et al.* (2020). Adaptada pela autora.

Algumas modificações químicas melhoram as propriedades físico-químicas da quitosana. Existe a utilização dos derivados de quitosana na área da biomedicina e medicina, sendo relatado boa biodisponibilidade, biocompatibilidade, efeitos farmacológicos bactericidas, anticancerígenos, capacidade de induzir a agregação de eritrócitos, promover a ativação plaquetária e ativar outros sistemas de complemento comparado a quitosana (KACZMAREK *et al.*, 2019; KRITCHENKOV *et al.*, 2019; PAVONI *et al.*, 2019).

Determinadas substâncias apresentam curto tempo de liberação resultando em uma breve diminuição dos níveis plasmáticos, aspecto importante para alcançar uma liberação lenta sustentada com as nanopartículas derivadas de quitosana (OZLU *et al.*, 2019). Este polímero pode ser aplicado em métodos que envolvem o desenvolvimento de diversas formas farmacêuticas como microesferas, hidrogéis e NPs (FRANK *et al.*, 2014). Os derivados de quitosana também estão inclusos na nanotecnologia, sendo veículos de entrega e adjuvantes. Esses derivados podem expandir os campos de aplicação conforme as características químicas necessárias (ISLAM *et al.*, 2019).

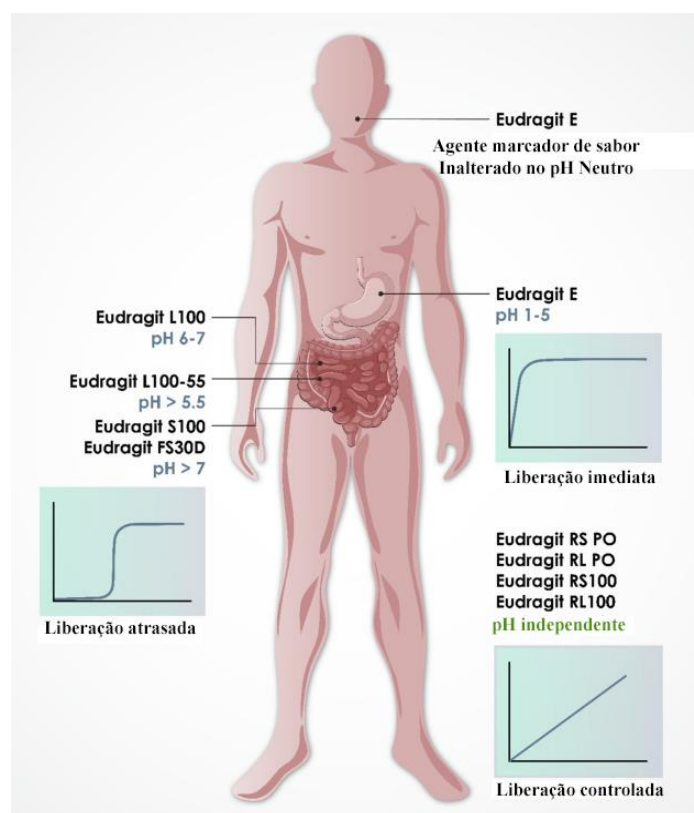
A natureza química da quitosana auxilia na ligação das NPs a diferentes grupos químicos, facilitando a adsorção de proteínas, metais e entrega direcionada de drogas (HALDORAI *et al.*, 2015). Por exemplo, a adesão à mucosa é dada pela capacidade de se aderir à mucosa e ser temporariamente retido. Ocorre, normalmente pela presença dos grupos de ligação de hidrogênio (grupos carboxila, hidroxila, amino e sulfato) ou cargas de ânion/cátion. Por fim, a adsorção desse polímero ocorre por atração eletrostática com as proteínas da mucosa, em conjunto com a ligação de hidrogênio e as propriedades hidrofóbicas do material (XIA *et al.*, 2015).

A quitosana e derivados podem ser encontrados como micelas, microesferas, nanopartículas e géis. O tamanho pequeno das nanopartículas permite sua passagem por barreiras biológicas para entrega efetiva de fármacos aos locais alvo. Dentre outras aplicações, a quitosana e derivados têm sido incluídos como materiais de ação antibacteriana não tóxicos (BELBEKHOUCHE *et al.*, 2019). Nessa aplicação, o sal de amônio quaternário de quitosana é o mais amplamente utilizado e especulam-se formas de ação: são carregados positivamente, enquanto as bactérias são carregadas negativamente (adsorção eletrostática); decorrida a adsorção de bactérias, ocorre a entrada no interior das células bacterianas e se ligam ao DNA, interferindo na transcrição do DNA bacteriano consequentemente inibindo o crescimento bacteriano; inibição da absorção de oligoelementos e nutrientes (CHEAH *et al.*, 2019).

2.2.4 Eudragit® RS100

Eudragit® são polímeros representantes mais famosos dos polimetacrilatos. A família Eudragit® é caracterizada pelas propriedades químicas, apresentando uma estrutura comum na qual diferem por seus substituintes e funções. Além disso, são separadas em catiônicas, aniônicas e neutras, enquanto podem ser disponíveis como soluções orgânicas, grânulos, dispersões aquosas e pós (PATRA *et al.*, 2017). Dentre os tipos de Eudragit® estão o Eudragit E, Eudragit RL, Eudragit RS, Eudragit FS 30, Eudragit S100, Eudragit L100 e Eudragit L100-55. Os tipos de polímeros Eudragit e os locais de liberação de fármacos são destacados na figura abaixo:

Figura 6- Liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas produzidas com polímeros Eudragit®.



Fonte: Dos SANTOS *et al.* (2021). Adaptada pela autora.

O Eudragit E, por exemplo, é um copolímero catiônico, solúvel em pH gástrico (até 5). É incluso na formulação de dispersões sólidas, preparações tópicas, sublinguais e comprimidos (Dos SANTOS *et al.*, 2021; PERALTA *et al.*, 2021; PATRA *et al.*, 2017). Já Eudragit RL é um polímero permeável e catiônico, composto por metacrilato de metila, acrilato de etila e uma porcentagem menor de éster de ácido metacrílico com grupos de amônio quaternário, no qual apresenta insolubilidade em água e inchamento independente do pH, tornando altamente permeável (BAGDE *et al.*, 2021). Embora o Eudragit RS tenha mesma estrutura molecular, a diferença no conteúdo do grupo funcional amônio é responsável pela sua menor permeabilidade (PARK *et al.*, 2017). Entre as aplicações na indústria farmacêutica, estão incluídas na formulação de nanopartículas, comprimidos revestidos, entre outros sistemas de liberação sustentada (Dos SANTOS *et al.*, 2021; BEBER *et al.*, 2016).

Outro polímero aniônico é o Eudragit FS 30 D, disponível na forma de dispersão aquosa a 30%. Sua aplicação entende-se a formulação de sistemas colônicos, com solubilidade acima de pH 7,0 (THAKRAL *et al.*, 2013). Por fim, outras variações como Eudragit S100, Eudragit L100 e Eudragit L100-55 têm propriedade aniônica formados por poli(ácido metacrílico-co-acrilatos). As diferenças estão nos grupos carboxílicos ativos de Eudragit S100 (29,2% de seu peso molecular) e Eudragit L100 (48,3% de seu peso molecular), o que confere diferentes perfis de solubilidade dependentes do pH.

Especificamente, o Eudragit RS pode ser utilizado em fármacos em que se deseje uma liberação rápida, seguida de liberação lenta. Inclusive, esse polímero já foi utilizado na impressão 3D de um inovador sistema de administração de medicamentos como polímero principal por KRAUSE *et al.* (2019) devido à sua insolubilidade em água e baixa permeabilidade (KRAUSE *et al.*, 2019). Desta forma, destaca-se que os polímeros Eudragit®, não somente são componentes principais da matriz polimérica, sobretudo podem ser materiais de revestimento e agir modificando o perfil de liberação medicamentoso. Em várias formulações a principal função pode ser a formação da matriz polimérica, mas pode ser aplicado como revestimento e/ou modificador de liberação de medicamentos conforme descrito acima (Dos SANTOS *et al.*, 2019).

Enquanto entre pesquisas sobre materiais poliméricos para entrega controlada de fármacos, é descrito que os polímeros Eudragit® favoreciam a formulação de moléculas de drogas com sensibilidade ao pH. Dentre seus aspectos incluem-se o alto nível de estabilidade, encapsulamento de grande quantidade do fármaco e liberação controlada (KISHORI *et al.*, 2013).

2.3 Nanosseguurança

A expansão do uso dos nanomateriais (NMs) originou preocupações com os possíveis efeitos toxicológicos dessas substâncias à saúde humana e ao meio ambiente. Conceitua-se o termo nanosseguurança como a avaliação dos riscos à saúde humana e ao meio ambiente, além dos riscos ecológicos e análise do nível de toxicidade causado pelo uso de NMs. Esse termo ganha destaque principalmente nos produtos que apresentam contato direto com os sistemas biológicos, incluindo NMs que constituem dispositivos médicos, cosméticos e os produtos farmacêuticos (ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). Estudos apontam que os materiais nanométricos apresentam propriedades físico-químicas diferentes daquelas do material de origem, consequentemente o que altera a sua

reatividade em sistemas biológicos. Assim, é válido aplicar metodologias para avaliação dos efeitos adversos dos NMs. A condução de estudos nessa temática requer ser bem estruturada, por meio de um protocolo definido precisamente para compreender o nível de exposição e sua distribuição no organismo, conferindo uma correta avaliação da segurança do produto (SINGH *et al.*, 2019).

Para avaliação de segurança de NMs os seguintes requisitos podem ser empregados para avaliação de risco, a qual também é adotada para os produtos químicos convencionais como: (1) Avaliação de efeitos, (2) avaliação de exposição e a (3) caracterização de risco. Esses itens seguem conforme a sigla em inglês “REACH” que em português significa: Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas. Além da realização de experimentos *in vitro* e/ou *in vivo*, podem ser incluídos aspectos que influenciam a toxicidade, como por exemplo, distribuição de tamanho, reatividade, solubilidade em água, propriedades de superfície e a estabilidade a longo prazo (SCHWIRN *et al.*, 2020; BOROS & OSTAFE, 2020). Na figura 7 estão ilustradas as etapas do REACH.

Figure 7- Requisitos para avaliação de risco para nanomateriais (NMs) de acordo com o REACH.



Fonte: ZIELIŃSKA *et al.* (2020). Adaptado pela autora.

Sabe-se que a carga elétrica superficial das nanopartículas (carga positiva ou negativa) é um fator que influencia a interação dos NMs com subsistemas ou membranas

biológicas em um ambiente aquoso (SINGH *et al.*, 2019). Por exemplo, com a partícula carregada negativamente, esta vai ser atraída por superfícies carregadas positivamente e vice-versa. Em geral, evidenciam as nanopartículas carregadas positivamente como mais lesivas podendo danificar as membranas celulares, além da interação com as enzimas, proteínas e o risco maior de genotoxicidade na interação com o DNA (DOKTOROVOVA *et al.*, 2014). O revestimento da superfície é outro fator que afeta a carga superficial, o qual pode manter a partícula estável ou ser projetado de modo que possa reconhecer e reagir com ligações específicas. Enquanto o tamanho pode causar citotoxicidade, pois as nanopartículas menores têm área de superfície maior e, conseqüentemente, maior interação com componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas, ácidos graxos e carboidratos (HUANG *et al.*, 2017).

Na avaliação da nanosseguurança propõe-se a inserção de modelos biológicos para verificar a toxicidade de substâncias ou agentes tanto *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, as células isoladas e a exposição de substâncias fazem parte de modelos *in vitro*. Enquanto, testes *in vivo* podem observar em organismos vivos alterações em seu desenvolvimento como parâmetros de crescimento, reprodução, mortalidade, etc. (SHIN *et al.*, 2018). Embora seja crescente esse campo de estudo, a avaliação da toxicidade das nanopartículas ainda não apresenta padronização, resultando em empecilhos na comparação dos resultados sobre o perfil toxicológico de muitos NMs. Os testes *in vitro* podem ser obtidos em menor tempo e apresentam menores custos financeiros comparado aos testes *in vivo*, contudo apenas nesse último que é possível inferir os potenciais resultados da interação com organismos vivos que podemos melhor relacionar a saúde humana (SAVAGE *et al.*, 2019).

2.4 Covid-19 e patogênese

Desde os primórdios da civilização as doenças infecciosas afligem a humanidade, contudo o surto de Covid-19 evidenciou grande preocupação mundial. O Covid-19 é uma doença infecciosa causada pelo SARS-CoV-2, que foi o vírus causador da pandemia de Covid-19. A nomenclatura SARS-CoV-2 foi designada pelo Grupo de Estudos sobre Coronaviridae (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Esse grupo foi responsável pela classificação de vírus e a nomenclatura de táxons da família Coronaviridae. O SARS-CoV-2 é a denominação do vírus que pertence à espécie

Coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda, abreviado como SARS-CoV-2, se tratando do sétimo Coronavírus humano descrito que inclui também o SARS-CoV e o MERS-CoV (HAN *et al.*, 2021).

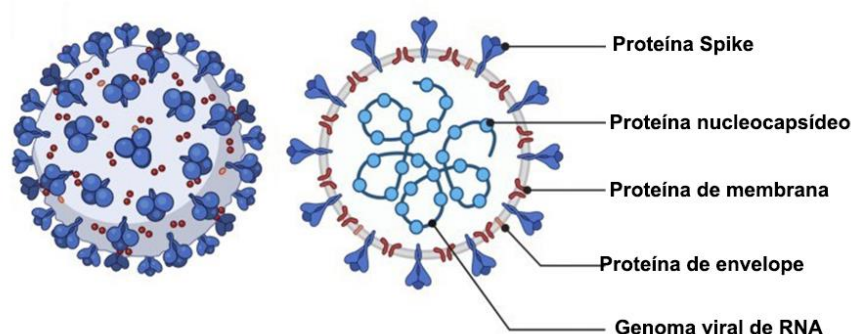
Na taxonomia, a família Coronaviridae pertence a ordem Nidovirales, abrangendo 2 subfamílias, 5 gêneros, 26 subgêneros e 46 espécies de vírus. Destaca-se que os Coronavírus pertencem ao gênero Betacoronavirus, subgênero Sarbecovirus. São pertencentes à subfamília Coronavirinae da família Coronaviridae, enquanto a subfamília divide-se em quatro gêneros principais como: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus. Vale ressaltar que em mamíferos apenas os gêneros Alphacoronavirus e Betacoronavirus causam a infecção, enquanto Gammacoronavirus e Deltacoronavirus infectam os pássaros (WOO *et al.*, 2012).

O vírus foi identificado pela primeira vez em dezembro de 2019 em Wuhan, na China, sendo declarada como Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 30 de janeiro de 2020 (HAN *et al.*, 2021). Posteriormente, decorridos menos de 3 meses em 11 de março de 2020 foi declarada como pandemia global, uma vez que a infecção viral rapidamente se espalhou por diversos países (WHO, 2020). Os principais surtos de doenças infecciosas causadas por Coronavírus de morcegos (SARS e a Covid-19) foram originados na China. Dentre os fatores que culminaram para o surgimento elencam-se: vasto território associado à diversidade climática e grande biodiversidade (inclui a de morcegos e vírus); neste país, a maioria dos morcegos hospedeiros de Coronavírus vivem próximo a humanos (potencial risco de transmissão viral) e para a cultura alimentar chinesa os animais vivos recentemente abatidos podem ser mais nutritivos (FAN *et al.*, 2019). A relação entre os reservatórios do vírus do tipo SARS-CoV em morcegos-ferradura e a alimentação de mamíferos exóticos no sul da China poderia ocasionar consequências como o ressurgimento da SARS e outros novos vírus (CHENG *et al.*, 2007).

Em aspectos estruturais, os Coronavírus são vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples não segmentado com sentido positivo e são encapsulados em um envelope de membrana com diâmetro médio de 75-150 nm. Esse envelope é coberto com pontas de glicoproteína, originando a sua aparência de coroa (corona é termo latino para coroa). Inclusive, os Coronavírus apresentam as proteínas de pico que se dividem em dois domínios: S1 e S2. O domínio S1 liga-se ao receptor, enquanto o domínio S2 atua na fusão da membrana celular. Quanto ao tamanho do seu genoma, é o maior tamanho conhecido em um vírus de RNA variando de 26 kb a 32 kb (CHEN *et al.*, 2020). Também

um total de quatro proteínas estruturais principais são codificadas no genoma viral do SARS-CoV-2, as quais são: glicoproteína de superfície de pico (S), proteína de membrana (M), proteína de envelope (E) e proteína de nucleocapsídeo (N). Na figura 8 podem ser observadas essas estruturas:

Figura 8- Estrutura do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: MAJUMDER & MINKO, 2021. Adaptada pela autora.

Essa patologia tem como características o alto contágio, na qual sua transmissão inter-humana ocorre principalmente pelas vias aéreas. Os principais sintomas clínicos incluem febre, expectoração, fadiga e falta de ar. Outros sintomas menos comuns são a dor de garganta, dor de cabeça, falta de ar e aperto no peito, além de sintomas como vômitos, diarreias e outras complicações gastrointestinais (WU & MCGOOGAN, 2020). Embora todos os Coronavírus estejam envolvidos em agravos no trato respiratório, o vírus SARS-CoV-2 também afeta tecidos como o coração, sistema gastrointestinal, o fígado, os rins e o sistema nervoso central, levando à falência de múltiplos órgãos (ZHU *et al.*, 2020).

Desde o início da pandemia até o momento, já foram descobertas diversas mutações no genoma viral, fato que sugere que existem centenas de cepas desse vírus espalhadas pelo mundo. Dentre os locais principais de variação, uma encontra-se no gene da proteína Spike (S) e o outro na estrutura de leitura aberta do gene acessório ORF8 (WOLF, 2018). Desta maneira, pelo papel da proteína S no processo de infecção por SARS-CoV2 diversas estratégias visam atuar contra o vírus, conforme pode ser visto, por exemplo, na formulação de vacinas (CHEN *et al.*, 2020).

O processo de infecção na célula hospedeira ocorre pela entrada do SARS-CoV-2 através dos endossomos ou via fusão da membrana plasmática, a qual é mediada por proteínas S usando a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor de

entrada. Ao ser absorvido pelos endossomos, a catepsina L vai ativar a proteína do pico. Ainda, a proteína S pode ser ativada pela protease celular TMPRSS2 em estreita proximidade com o receptor ACE2. Por meio dessa ativação, ocorre a fusão da membrana viral com a membrana plasmática (HOFFMANN, 2020).

Todos os vírus necessitam de uma célula hospedeira para sua replicação viral, que normalmente inclui as etapas de fixação, penetração, remoção do revestimento, replicação, montagem e liberação. Para a replicação viral, mecanismos são descritos, por exemplo, o gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) é responsável pela replicação do RNA da proteína estrutural, resultando em quatro proteínas virais estruturais essenciais (N, S, M e E) (MAJUMDER & MINKO, 2021). Essas proteínas estruturais são traduzidas pelos ribossomos que vão se ligar ao retículo endoplasmático (RE), com superfície a ser preparada para a montagem do Víron que é uma partícula viral completa e, portanto, a forma infecciosa do vírus. Os denominados nucleocapsídeos permanecem na parte do citoplasma e são montados a partir do RNA genômico. Posteriormente, se fundem com o precursor do Víron que é conduzido do RE através do Aparelho de Golgi para a superfície celular por meio de pequenas vesículas. Por fim, no processo de liberação do vírus após a replicação estes são liberados da célula infectada através de exocitose (MCKIMM-BRESCHKIN, 2013). Um fato importante em relação a entrada do vírus nas células-alvo, está no aumento da expressão da ACE2 que desencadeia uma maior suscetibilidade ao vírus pois o ACE2 serve como um receptor para o vírus permitindo a sua entrada nas células. Outro fator é que em indivíduos com mais idade é mais comum essa maior expressão da ACE2, juntando dois fatores preocupantes quanto a invasão viral (BAVISHI; MADDOX; MESSERLI, 2020).

Como formas de tratamento antiviral ou abordagens para prevenção destacam-se: inibição da replicação do genoma viral impedindo que os vírus adentrem nas células hospedeiras ou a supressão em uma ou mais etapas da replicação; via sistema imune com a vacinação para criar memória contra o vírus; transferência de anticorpos produzidos no plasma do paciente recuperado e tratamento dos agravos do sistema (MAJUMDER & MINKO, 2021). Em relação aos agravos inflamatórios, na fase inicial respostas do sistema imunológico eliminam a reprodução viral para impedir a progressão da doença para a chamada fase de hiperinflamação. Caso a infecção não for combatida, ocorre a fase de resposta inflamatória severa ocasionando a tempestade de citocinas e elevação de marcadores inflamatórios pelas células imunes inatas. Tais efeitos induzem a fibrose pulmonar, falta de ar, redução da saturação de oxigênio e lesões sistêmicas, resultando

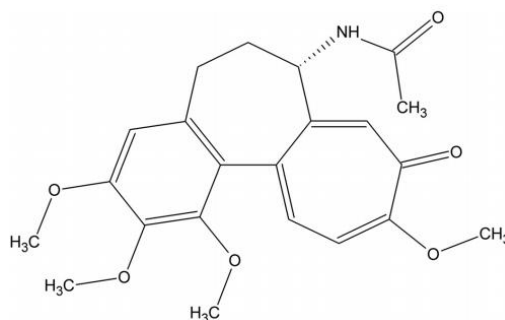
em síndrome da angústia respiratória aguda e morte do paciente (SHI *et al.*, 2020). Por fim, outra característica da Covid-19 é a tempestade de citocinas, a qual foi confirmada em pacientes da unidade de terapia intensiva (UTI). Além disso, a presença de níveis aumentados de citocinas inflamatórias no plasma está relacionada a gravidade da doença e prognóstico do paciente (HUANG *et al.*, 2020).

A escolha dos fármacos alvos para atuar contra a Covid-19 precisam levar em conta os mecanismos de combate a infecção. Diversos fármacos são estudados devido seu potencial, seja regulando respostas imunes, modificando o ambiente intracelular, inibindo a polimerase viral ou atuando na ligação da proteína S ao ACE2 que é um fator crítico para as primeiras etapas da infecção. Entre os medicamentos pesquisados estão o Arbidol, Interferon I, Tocilizumab, Cloroquina / Hidroxicloroquina, Remdesivir, Lopinavir, ritonavir e a colchicina (MAJUMDER & MINKO, 2021).

2.5 Colchicina

A colchicina é um composto descrito como um alcaloide tricíclico extraído da planta herbácea *Colchicum autumnale* também conhecido como açafrão-do-prado. A sua eficácia terapêutica é reconhecida desde a antiguidade, sendo prescrita principalmente na terapia de gota e na prevenção de ataques agudos da Febre Familiar do Mediterrâneo (FFM), doenças imunes e inflamatórias (DINARELLO *et al.*, 1974). Por meio das pesquisas dos químicos e farmacêuticos franceses Pierre-Joseph Pelletier (1788-1842) e Joseph Bienaimé Caventou (1795-1877) a substância foi isolada nas raízes de *Colchicum autumnale* em 1819 e reintroduzida na farmacopeia do século XIX (KARAMANOU *et al.*, 2018). Na figura abaixo é demonstrada a estrutura molecular do alcaloide:

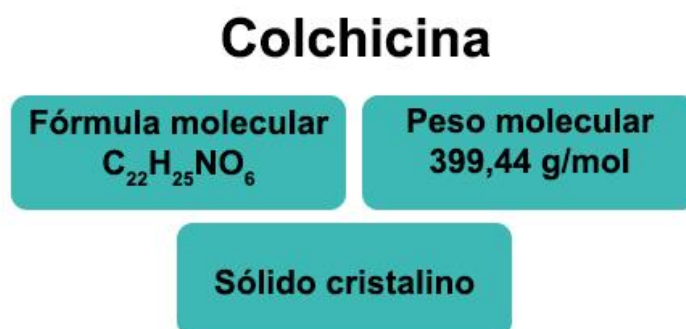
Figura 9- Estrutura molecular da Colchicina



Fonte: DAHAN; SABIT; AMIDON (2009).

Em 1833 esta substância foi analisada pelo farmacêutico e químico alemão Philipp Lorenz Geiger (1785-1836) o qual designou sua nomenclatura. Posteriormente em 1884 o farmacêutico francês Alfred Houde (1854-1919) obteve pela primeira vez o composto em forma pura cristalizada em grânulos de 1 mg (KARAMANOU *et al.*, 2018). De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutico é uma droga de classe III que apresenta baixa permeabilidade e alta solubilidade (DAHAN; SABIT; AMIDON, 2009). Trata-se de uma medicação antiga administrada para o tratamento de várias patologias inflamatórias, com mecanismo de ação e efeitos anti-inflamatórios extensivamente relatados na literatura (SLOBODNICK *et al.*, 2018). Abaixo algumas propriedades físico-químicas da substância:

Figura 10- Características físico-químicas da Colchicina.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

2.5.1 Metabolismo e mecanismo de ação da Colchicina

A absorção do fármaco após ser ingerido por via oral é rápida obtendo as concentrações plasmáticas máximas em torno de meia-hora a duas horas após decorrida a administração. As maiores quantidades da substância e de seus metabólitos chegam ao trato intestinal, na bile e nas secreções intestinais. Ademais, as classes de fármacos podem se enquadrar em critérios como baixo índice terapêutico, que é definido pela razão entre a dose letal da droga para 50% da população (DL50) e dose efetiva mínima para 50% da população (DE50), ou seja, a dose terapêutica é próxima da tóxica (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2005).

Detalhadamente, a metabolização da substância ocorre no tecido hepático, principalmente através da desmetilação mediada pelo citocromo CYP3A4 (TATEISHI *et al.*, 1997). É uma das principais vias para o metabolismo da colchicina a O-desmetilação, no qual P450 3A desempenha papel relevante no processo. Os metabólitos O-glucuronidado, conjugados de O-sulfatação e os conjugados de glutathione derivados de colchicina desmetilada foram detectados na bile de rato (XU *et al.*, 2008). Após a administração oral, o fármaco apresenta farmacocinética linear na faixa de dose de 0,5 a 1,5 mg com área sob os valores da curva proporcionais à dose administrada. Outro fator é que os níveis plasmáticos devem ser proporcionais à fração absorvida, relatando que mudanças nesses níveis no plasma também podem ser oriundos da função alterada de glicoproteína-P (P-gp) / proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas 2 (MRP2).

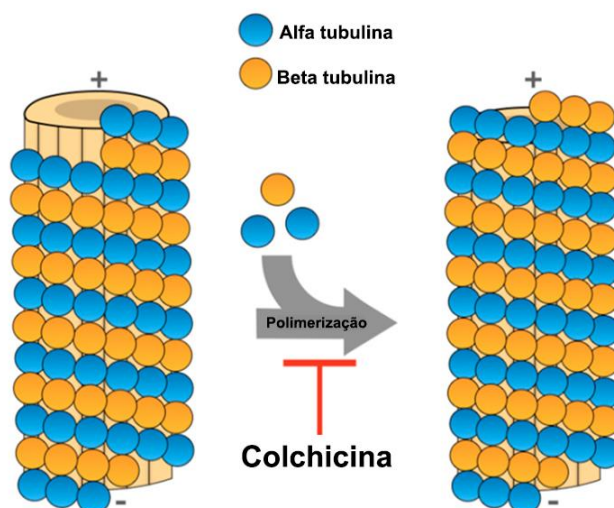
As barreiras descritas acima que fazem parte da metabolização relacionadas a sua absorção reduzida e variável, visto que a biodisponibilidade oral absoluta do fármaco se encontra na faixa de 40% (ROCHDI *et al.*, 1994).

Estudo de TERKELTAUB *et al.* (2011) analisou as interações da colchicina com sete inibidores CYP3A4 e P-gp [ciclosporina, cetoconazol, ritonavir, claritromicina, azitromicina, verapamil de liberação estendida e diltiazem de liberação estendida]. Concluiu que a dose de colchicina deve ser diminuída quando é administrada concomitantemente com cada um desses agentes, com exceção para a azitromicina. Ainda, pode ser observada que a administração concomitante de inibidores da CYP3A4 ou da P-gp podem limitar a segurança e tolerabilidade, e conseqüentemente, requer a diminuição da dose máxima de colchicina (HENTGEN *et al.*, 2013). Resumidamente, a principal enzima envolvida na desmetilação da colchicina é a CYP3A4, que apresenta interações medicamentosas que podem resultar em toxicidade. A diferença interindividual na atividade de CYP3A4 explica a variação em seu efeito terapêutico, assim esse risco ocorre quando potentes inibidores ou substratos de CYP3A4 são co-administrados com a colchicina (TATEISHI *et al.*, 1997). Deve ser enfatizado que a toxicidade associada ao tratamento com colchicina é rara e evitável seguindo recomendações de uso, pois esta apresenta um bom perfil de segurança em longo prazo (OZEN *et al.*, 2016).

Já o mecanismo de ação da colchicina é baseado na inibição da polimerização da tubulina e da geração de microtúbulos, exercendo efeitos sobre as moléculas de adesão celular, quimiciocinas inflamatórias e o inflamassoma (RAVELLI *et al.*, 2004). Portanto essa capacidade da colchicina em se ligar a dímeros de tubulina livres e bloquear a

polimerização de microtúbulos é um dos mecanismos mais relevantes, uma vez que parece associado a interrupção das atividades das células inflamatórias e liberação de citocinas (DALBETH; LAUTERIO; WOLFE, 2014). Abaixo, na figura 11, adaptado de FONG *et al.* (2019) esse mecanismo é ilustrado:

Figura 11- Colchicina inibe a polimerização da Tubulina.



Fonte: FONG *et al.* (2019). Adaptada pela autora.

De acordo com SAMPEDRO-NÚÑEZ *et al.* (2018) a ação do medicamento como antimitótico interfere no processo de divisão celular, o que afeta a montagem e a desmontagem dos microtúbulos durante a mitose. Ainda, se sabe que grande parte dos fármacos antimitóticos incluem agentes anticâncer tóxicos que atacam de preferência as células cancerosas, pois estas se dividem mais rápido que as células normais.

2.5.2 Aplicação terapêutica e recomendação de uso da colchicina

Além da reconhecida aplicação clínica na doença gota, também se inclui o tratamento da doença de Behçet, pericardite aguda e recorrente, dentre outras doenças autoinflamatórias como a FFM (HENTGEN *et al.*, 2013; LIANTINIOTI *et al.*, 2018; SCHATTNER, 2021). Em 1974 três estudos estabeleceram a eficácia da colchicina para a patologia, nos quais identificaram sua capacidade em prevenir ataques clínicos da FFM com uso de dose de 0,5 mg (2x ao dia) durante 2 meses, para redução significativa em comparação ao placebo (ZEMER *et al.*, 1974). As pesquisas subsequentes confirmaram

a sua eficácia, demonstrada em um estudo com 350 crianças (6 a 13 anos de idade) tratadas com doses de colchicina de 1-2 mg/dia o qual houve em 64 % das crianças a remissão completa dos ataques febris e em 31% a remissão parcial (ZEMER *et al.*, 1991). A colchicina via oral demonstra ser segura e bem tolerada quando seguidas as doses recomendadas. Isso porque em um percentual de até 20% dos pacientes com FFM em doses terapêuticas ocorrem efeitos colaterais gastrointestinais como cólicas, dor abdominal e diarreia, que são efeitos geralmente leves e transitórios. Para evitar, ou mesmo reduzir esses efeitos colaterais, a divisão da dose diária é importante, contudo, pode reduzir a conformidade do tratamento e afetar de forma negativa a resposta ao medicamento (OZEN *et al.*, 2016).

Quanto a exposição de diferentes grupos populacionais, a colchicina em sua forma livre foi criteriosamente avaliada quanto aos seus efeitos tóxicos. Sabe-se que apresenta uma janela terapêutica estreita, no qual a dose efetiva é próxima a sua dose tóxica. Desta forma, os pacientes não devem receber mais do que o máximo que pode ser tolerado. Esses valores são inferiores a 3 mg / dia em adultos e menos de 2 mg / dia em crianças e pré-púberes (HENTGEN *et al.*, 2013). No grupo das gestantes, por exemplo, segundo estudo de DIAV-CITRIN *et al.* (2010) não foram observadas principais anomalias congênitas entre gravidezes expostas à colchicina e gravidezes com exposição não-teratogênica. Além disso, anomalias citogenéticas também não foram relatadas nesses grupos, o que sugere a segurança desse medicamento para as mulheres grávidas.

Para crianças, um grupo interdisciplinar recomendou uma dose inicial de 0,5 mg/dia para menores de 5 anos; 1,0 mg / dia para crianças de 5 a 10 anos e 1,5 mg / dia para crianças com mais de 10 anos, podendo aumentar se necessário para não mais que 2,0 mg/dia (KALLINICH *et al.*, 2007). Para os pacientes adultos e pediátricos com FFM estudos recomendaram como dose inicial 0,6 mg/dia (2-4 anos e 4-6 anos de idade) e 0,9 mg/dia para pacientes (6 a menos de 12 anos) (BERKUN *et al.*, 2012). A administração da colchicina exige cautela, pois é uma droga com índice terapêutico estreito e seus efeitos colaterais podem ser tóxicos quando ocorre uma dosagem mais elevada. Por exemplo, a toxicidade pode ocorrer em aproximadamente 3 ng / mL, que é um valor muito próximo das concentrações plasmáticas efetivas em estado estacionário que variam na faixa de 0,5 a 3 ng / mL (FERRON *et al.*, 1996). Com isso, observa-se que existe uma faixa curta entre os valores efetivos e tóxicos para essa substância.

2.5.3 Colchicina e Inflamação

Estudos relatam que a colchicina atua na interrupção das atividades das células inflamatórias e liberação de citocinas, portanto BEN-CHETRIT *et al.*, (2006) ao realizarem a incubação de células endoteliais vasculares humanas por curtos períodos (30 ou 120 minutos) observaram uma alteração da expressão dos genes envolvidos no ciclo celular e sua regulação. Já nos períodos de incubação mais longos (12-24 horas) resultam na regulação da expressão de genes envolvidos na migração dos neutrófilos ou outros processos inflamatórios. De acordo com PASCHKE *et al.* (2013) a colchicina altera a deformabilidade dos neutrófilos, reduzindo a elasticidade citoplasmática relacionada a diminuição do número de microtúbulos citoplasmáticos. Também é responsável por alterar a distribuição de moléculas de adesão celular tanto em neutrófilos quanto em células endoteliais, diminuindo a transmigração de neutrófilos.

Segundo APOSTOLIDOU *et al.* (2016) que estudou a inflamação mediada pela FFM, a colchicina prejudica a liberação de interleucina 1 Beta (IL-1 β) em armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Ainda, a capacidade de ligação a tubulina alcança várias ações na célula, que inclui a inibição da montagem do inflamassoma NLRP3 (MISAWA *et al.*, 2013). Inflamassomas são estruturas necessárias para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e em reconhecer sinais de perigos. O NLRP3 trata-se de um complexo multiproteico citosólico ativado por sinais de perigo aos tecidos e está interligado à produção de interleucinas IL -1 β e IL-18 (MARTINEZ *et al.*, 2015). Detalhadamente, pode bloquear a endocitose dos cristais e a estimulação do complexo inflamassoma. Esse efeito pode ser transcricional pelo bloqueio do gene *MEFV*, a fim de inibir a produção de proteínas presentes no complexo inflamassoma (NIDORF; EIKELBOOM; THOMPSON, 2014). Outra ação consiste em evitar a mobilização de uma proteína-chave nesse complexo, que é a proteína associada à apoptose contendo caspase e domínio de recrutamento de ativação (CARD) (ASC). Desta forma não ocorre a mobilização da mitocôndria para o retículo endoplasmático, para não se localizar com o restante do complexo do inflamassoma (MISAWA *et al.*, 2013).

A colchicina é capaz de suprimir agudamente a produção cardíaca local de citocinas inflamatórias em pacientes com síndrome coronariana aguda. É demonstrado que receptores similares a domínios de oligomerização de ligação a nucleotídeos e inflamassoma 3 (NLRP3) estão ligados a inflamação estéril endógena após o infarto do

miocárdio. Assim, reportou-se que a colchicina reduziu as citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-18) e o tamanho do infarto do miocárdio (MARTINEZ *ET al.*, 2015).

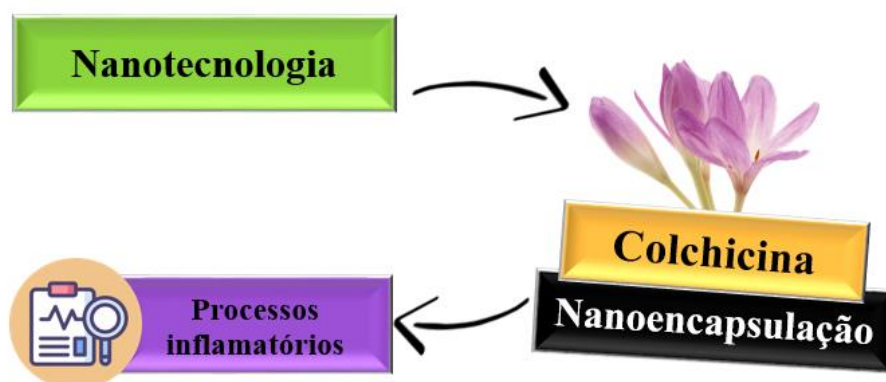
Constatou-se que o tratamento de curto prazo com a colchicina atenuou as citocinas pró-inflamatórias e o inflamassoma NLRP3, no caso dessa patologia melhorando a função cardíaca, insuficiência e a sobrevida após o infarto (FUJISUE *et al.*, 2017). Dentre outras funções, a colchicina controla a inflamação mediada pela atividade dos glóbulos brancos, inibindo a produção de glóbulos brancos e liberação de numerosas citocinas e pirogênicos (CHIA; GRAINGER; HARPER, 2008).

Por fim, BONAVENTURA *et al.* (2021) comprovaram que vírus como SARS-CoV-2 pode induzir a ativação do inflamassoma NLRP3, resultando na ativação de vias pró-inflamatórias. Desta forma, o bloqueio farmacológico do inflamassoma NLRP3 pela colchicina gera potencial interesse na terapêutica de doenças inflamatórias, dentre as quais a Covid-19.

2.5.4 Utilização de Colchicina para tratamento da Covid-19

É sugerido que a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 são um mecanismo inflamatório nos pacientes com Covid-19 em condição grave, sendo correlacionado os mecanismos da colchicina com a melhora em pacientes acometidos por Covid-19. Portanto, a colchicina é um potencial candidato a terapia em pacientes com a doença, pois trata-se de um medicamento barato com perfil de segurança adequado para minimizar as condições inflamatórias características dessa doença (NASIRIPOUR; ZAMANI; FARASATINASAB, 2020; REYES *et al.*, 2021; BONAVENTURA *et al.*, 2021). Desta forma, é uma nova forma farmacêutica do fármaco colchicina para utilização em doenças como a Covid-19 e demais processos inflamatórios. Esse mecanismo de ação já conhecido da colchicina pode ser avaliada e aprimorado após a nanoencapsulação. Na figura abaixo é destacada a proposta de nanoencapsulação da colchicina:

Figura 12- Nanoencapsulação da colchicina.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Estudos prévios apontam que um subgrupo de pacientes acometidos pela Covid-19 tem uma síndrome de liberação de citocinas (CRS). Essa síndrome é potencialmente fatal e caracterizada pelo aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), seguido da elevação dos níveis de interleucina (IL) -1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e interferon γ (IFN- γ) (LEE *et al.*, 2014). Na Covid-19 um perfil de citocinas pode ser detectado, visto pelo aumento de IL-2, IL-7, IFN- γ , fator estimulador de colônia de granulócitos, proteína inflamatória de macrófagos-1 α , proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e o TNF- α . Ademais, preditores como aumento da ferritina e da IL-6 estão interligados com a fatalidade na Covid-19 (HUANG *et al.*, 2020).

Ao decorrer da doença foram conduzidos diversos ensaios clínicos, como multicêntrico randomizado, multicêntrico duplo-cego controlado por placebo investigando a eficácia e segurança da colchicina na prática clínica em pacientes adultos com diagnóstico de Covid-19 (NCT04322682), contudo esse estudo foi interrompido.

Embora a Organização Mundial da Saúde declarou como fim de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), é sempre importante elucidar substâncias que possam atuar contra esse e outros vírus que possam ser descobertos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023; NASIRIPOUR; ZAMANI; FARASATINASAB, 2020).

2.6 *Drosophila melanogaster*

O uso de modelos experimentais como a *D. melanogaster* permite uma investigação ampla de grupos experimentais, permitindo desvendar o perfil toxicológico de nanocápsulas com diferentes revestimentos ou fármacos nanoencapsulados, como nesse caso a colchicina.

D. melanogaster é um artrópode pertencente à subespécie de insetos dípteros *Drosophilidae*, com aproximadamente 3 mm de comprimento que pode ser encontrado ao redor de frutas em processo de putrefação. Na área da ciência trata-se do primeiro organismo usado como modelo em estudos experimentais com as células eucarióticas. Esse gênero apresenta cerca de 1500 diferentes espécies, sendo que a mais amplamente utilizada em estudos como organismo modelo é a *D. melanogaster* (HIRTH, 2010).

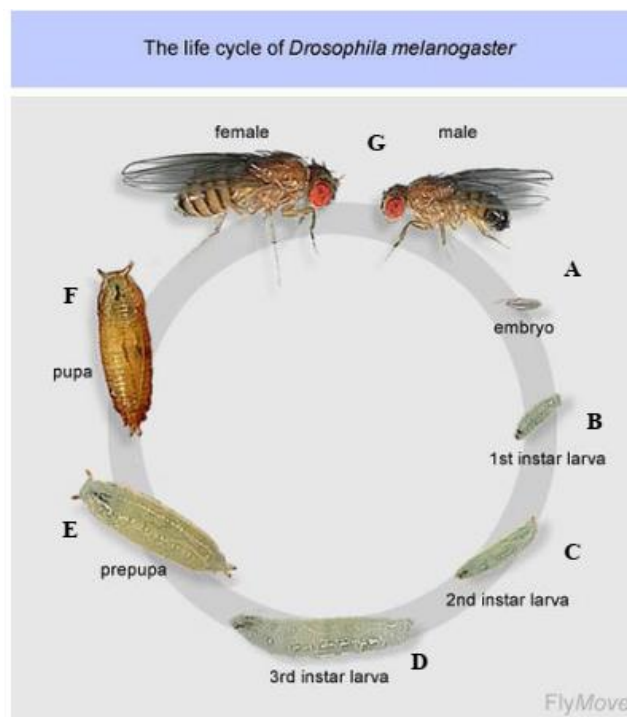
Essas espécies terão algumas diferenças ligadas tanto a sua aparência, comportamento e habitat. Assim, de acordo com as especificidades da pesquisa deve ser analisada a escolha do organismo modelo. O organismo modelo *D. melanogaster* é um importante modelo dos biólogos para pesquisas desde o início do século XX. Seu tamanho pequeno, rápido ciclo de vida e as ferramentas genéticas desenvolvidas pelos geneticistas pioneiros que fez com que estudos posteriores tivessem grandes avanços na biologia do desenvolvimento e neurociência (WANGLER *et al.*, 2015).

Anatomicamente a *Drosophila* apresenta, olhos compostos, asas e cerdas, características relevantes para se pesquisar os fenótipos de neurodegeneração sem que afete a sobrevivência do organismo (HIRTH, 2010; PARVATHI *et al.*, 2009).

As moscas apresentam ciclo de vida curto (10-12 dias), fácil manutenção em laboratório e uma vantagem nas pesquisas científicas, pela sua capacidade de prole numerosa. Somado ao que foi mencionado, o sequenciamento do genoma representa 75%-77% de homologia dos genes relacionados às doenças humanas, servindo como ferramenta eficaz ao avaliar a função gênica (HIRTH, 2010).

Na figura 13 estão representadas as fases do seu ciclo de vida começando com o embrião (A), 1º ao 3º estágio larval (B,C e D), pré-pupa (E), pupa (F) e fase adulta com a fêmea e o macho (G).

Figura 13- Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.



Fonte: PARVATHI *et al.*, 2009.

Drosophila apresenta benefícios quanto a avaliação da toxicidade de substâncias. Algumas vantagens devem ser elencadas: (1) observação de alterações ao longo das gerações pelo curto tempo de vida, (2) número pequeno de cromossomos e apresenta genoma sequenciado, (3) fácil manipulação genética, (4) apresenta homologia funcional com as doenças do ser humano, (5) presença de proteínas envolvidas na regulação gênica, expressão e metabolismo, (6) estudo mais criterioso dos estágios de desenvolvimento, (7) podem ser administradas maiores doses a mosca pois é permitido eticamente e por fim (8) o custo reduzido para sua manutenção (PAPPUS & MISHRA, 2018).

Dada a complexibilidade deste modelo os aspectos imunológicos e inflamatórios de *Drosophila* foram previamente destacados na literatura abrangendo estudos com vírus e outros patógenos. De forma mais específica, a mosca emprega múltiplas reações para resistir à infecção, onde as vias de sinalização e os processos biológicos associados às respostas imunes inatas são altamente conservados. Nesse caso, a sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B), a fagocitose e a apoptose estão presentes na imunidade inata desses invertebrados (YU *et al.*, 2022). Ainda, seu corpo pode secretar peptídeos antimicrobianos na hemolinfa, matando as bactérias e fungos. A imunidade inata da

Drosophila classifica-se em dois tipos: imunidade humoral que envolve os corpos gordurosos e hemolinfa e imunidade celular mediada por células imunes (principalmente hemócitos). Como um modelo *in vivo*, a *Drosophila* permitiu o estudo de mecanismos da imunidade e as interações patógeno-hospedeiro, visto que compartilha vias e apresenta fatores de sinalização conservados (YU *et al.*, 2022).

Além dos modelos de infecção bacteriana e fúngica, podem ser empregados modelos de infecção viral em *Drosophila*, os quais usam vírus para infectar a mosca e aqueles que expressam proteínas virais (MERKLING & van RIJ, 2013). No contexto da infecção viral em insetos a principal defesa imune é a via de interferência do RNA, no entanto, podem ser apontados possíveis papéis para as vias de sinalização imune centrais evolutivamente conservadas como Toll, Imd e JAK-STAT na imunidade antiviral (COSTA *et al.*, 2009).

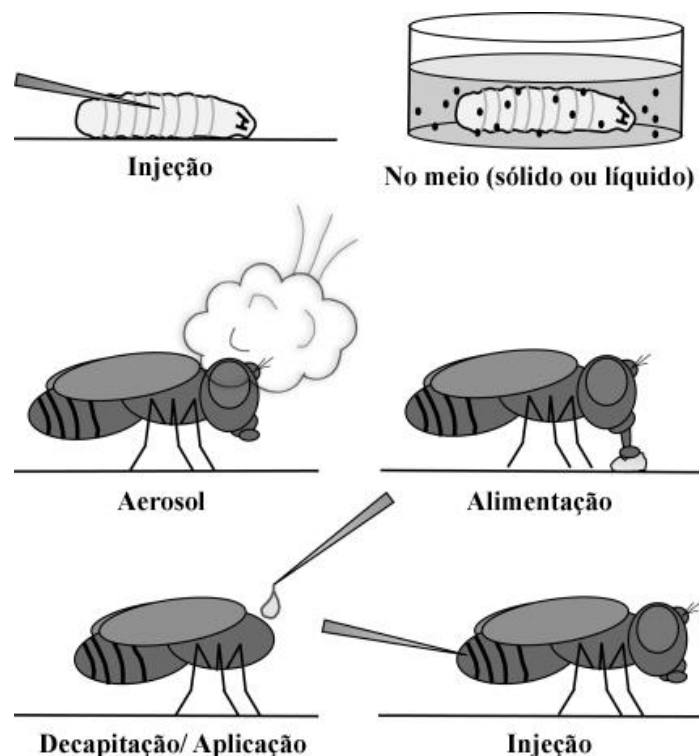
Por fim, esse modelo abre horizontes na pesquisa devido à presença de resposta imune contra diversos patógenos. Enquanto a ausência de uma resposta imune adaptativa impede compreender alguns aspectos da resposta imune, as vias de sinalização que medeiam as interações entre as células tumorais e o sistema imune inato (JNK, JAK-STAT, TNF, Toll/Imd/TLR) são altamente conservadas em moscas *Drosophila* (BANGI, 2013).

2.6.1 A *Drosophila* e o estudo da Nanotoxicidade

A utilização de modelos animais como ratos, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), *zebra fish* e *hidra* têm sido alvos em pesquisas para decifrar os aspectos tóxicos de produtos nanoencapsulados (PAPPUS & MISHRA, 2018). *D. melanogaster* podem ser expostas a diversas formas de produtos candidatos a fármacos, incluindo a administração oral pela mistura no alimento ou com papel filtro com sacarose, além de injeção direta em locais específicos no modelo experimental (JA *et al.*, 2007).

Para avaliação da toxicidade, testes de sobrevivência auxiliam a estabelecer as concentrações seguras e eficazes de um medicamento. Conforme já mencionado, devido ao curto ciclo de vida e baixo custo de manutenção a *Drosophila* permite a triagem de um grande número de candidatos a fármacos em um curto período, além de permitir traçar numa pesquisa ensaios comportamentais envolvendo escalada e locomoção (JA *et al.*, 2007). Na figura abaixo destacam-se vias de administração de substâncias para testes com candidatos a fármacos ou outras substâncias:

Fig. 14- Demonstração das vias de administração de medicamentos no modelo *Drosophila melanogaster*.



Fonte: PANDEY & NICHOLS (2011). Adaptada pela autora.

Para pesquisa das nanocápsulas ingeridas via oral, ressalta-se que o intestino da mosca compartilha homologia com o intestino dos vertebrados e da mesma forma como observada em outras estruturas, as vias imunológicas inatas são conservadas (APIDIANAKIS & RAHME, 2011).

Como descrito, a homologia é um aspecto importante quando comparamos modelos animais aos efeitos em humanos. A mosca apresenta homologia principalmente com: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo tecidos análogos ao esôfago de vertebrados, intestino delgado e intestino grosso (APIDIANAKIS & RAHME, 2011). Além disso, a estratificação interna do lúmen intestinal dos vertebrados tem uma camada de muco como revestimento, enquanto a *Drosophila* tem seu intestino revestido por uma membrana peritrófica (composta de quitina e glicoproteína) (KURAISHI *et al.*, 2011). Assim como em vertebrados, o pH apresenta variação nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal, sendo essa condição importante para o processo de absorção de nanocápsulas e outros produtos nanoencapsulados. Além disso,

as enzimas também participam da regulação da digestão, contudo são diferentes das que são encontradas nos vertebrados (JIANG *et al.*, 2015).

A mosca adulta de *Drosophila* é um organismo complexo, uma vez que é constituída por estruturas com funções equivalentes a tecidos humanos como o pulmão, rim, coração, intestino e órgãos reprodutivos. A parte do cérebro da mosca adulta é formada por neurônios que medeiam comportamentos complexos, que incluem os ritmos circadianos, sono, memória e aprendizado, namoro, alimentação, agressão, higiene e a navegação aérea. No sistema nervoso central (SNC) foi descrita que a resposta a medicamentos é similar aos efeitos em mamíferos (ANDRETIC *et al.*, 2008).

Por fim, através de estudos sabe-se que as proteínas da *Drosophila* estão envolvidas na regulação da expressão dos genes e metabolismo, além de apresentar importantes vias bioquímicas para o organismo humano (ADAMS *et al.*, 2000).

A *Drosophila* é um modelo experimental a ser usado para avaliações de toxicidade de nanocápsulas ingeridas por via oral, uma vez destacada a homologia da mosca. Muitas características do organismo *in vivo Drosophila* permitem traçar um perfil de toxicidade, elucidando os mecanismos moleculares subjacentes à toxicidade.

2.7 Estresse oxidativo e sua relação com toxicidade

Em condições fisiológicas, os níveis de espécies reativas são estáveis e importantes em processos biológicos como resposta imune, sinalização e morte celular. Além disso, nosso sistema de defesa antioxidante atua pelo equilíbrio entre a produção e neutralização de radicais livres (RL) por meio de enzimas antioxidantes (PIZZINO *et al.*, 2017). Contudo, ocorre o estresse oxidativo quando há desequilíbrio entre a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nas células e tecidos, com perda da capacidade de desintoxicar esses produtos reativos.

Atualmente, redefiniu-se o termo estresse oxidativo para dois mecanismos: dano macromolecular e interrupção dos circuitos redox de tiol, causando a sinalização celular aberrante e controle redox disfuncional. Quanto ao dano macromolecular este é relacionado aos mecanismos oxidativos ligados aos RL, que são moléculas com elétron desemparelhado e potencialmente reativas. RL podem participar de reações nas quais um único evento de iniciação pode ser propagado para danificar múltiplas moléculas. Assim como a peroxidação lipídica, no qual os ácidos graxos poli-insaturados das membranas

celulares são danificados por reações em cadeia de RL (RAY *et al.*, 2012; KUDRYAVTSEVA *et al.* (2016).

Outro mecanismo é a oxidação anormal, as quais podem interferir nas reações de oxidação-redução dos tióis que agem fisiologicamente na sinalização do receptor, regulação da transcrição, proliferação celular e apoptose. As proteínas com tiol atuam na sinalização redox e regulação fisiológica, porém são suscetíveis à oxidação. Tanto os oxidantes não radicais, quanto as reações oxidativas reversíveis de sinalização redox e controle servem também como componentes-chave do estresse oxidativo (SIES & JONES, 2007).

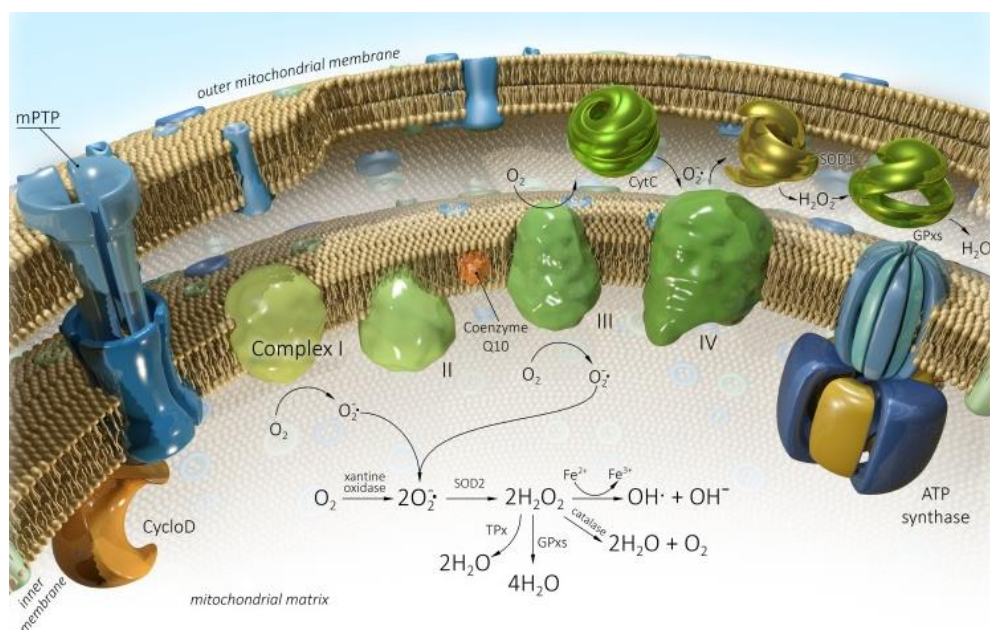
Mais detalhadamente no metabolismo oxidativo mitocondrial, o oxigênio é altamente reativo e instável podendo oxidar moléculas formando espécies reativas de oxigênio (ERO). Dentre as ERO derivadas da mitocôndria (mtROS) incluem-se: oxigênio singlete (O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e íon hidroxila (OH^-) (RAY *et al.*, 2012).

Primeiro ocorre a conversão do oxigênio em ânion superóxido com ação da xantina oxidase (XO) ou os complexos da cadeia respiratória mitocondrial I (NADH desidrogenase) e III (complexo bc1) (LI *et al.*, 2013).

O ânion superóxido é convertido pela superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 sendo a seguir degradado em água e oxigênio com ação da glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) ou tiorredoxina peroxidase (TPx). Por fim, também pode ser convertido em radical hidroxila e íon hidroxila através da reação de Fenton (LI *et al.*, 2013).

Na Figura 15 é possível visualizar a geração de mtROS, com componentes como: Complexo I - NADH desidrogenase, II - Succinato desidrogenase, III - complexo bc1, IV - Citocromo C oxidase, V - ATP sintase, Q - Ubiquinona, Cyt C - Citocromo C, Ciclo D - Ciclofilina D, mPTP - Poro de transição da permeabilidade mitocondrial, SOD - Superóxido dismutase, GPxs - Glutathione peroxidase, TPx - Tiorredoxina peroxidase).

Fig. 15- As espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS).



Fonte: KUDRYAVTSEVA *et al.* (2016).

Outro processo deletério envolvido no estresse oxidativo é a peroxidação lipídica que é originada principalmente pela formação de produtos secundários tóxicos como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal/4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Esses produtos migram com facilidade pelas membranas e citosol, ocasionando prejuízos tanto dentro quanto no exterior celular. Sabe-se que os produtos MDA e HNE podem modificar os resíduos de aminoácidos levando a danos nas proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana (KUDRYAVTSEVA *et al.*, 2016). Além disso, muitas proteínas contêm tióis sensíveis ao redox, e as reações dos sistemas de tiol ocorrem por transferências não radicais de dois elétrons. Resumidamente, os efeitos patológicos do estresse oxidativo nessas proteínas podem resultar em funções alteradas de receptores, transportadores, enzimas, fatores de transcrição e elementos estruturais (KUDRYAVTSEVA *et al.*, 2016).

Em relação a *Drosophila*, as moscas apresentam a SOD Cu/Zn citosólico e Mn mitocondrial, CAT, glutatona (GSH) redutase (GR), mas não possuem GPx (LEBOURG, 2001). Nesse modelo experimental diversas substâncias xenobióticas podem induzir toxicidade por mecanismos do estresse oxidativo, resultando na oxidação e dano de macromoléculas, além de afetar a atividade de enzimas antioxidantes.

Abaixo, na figura 16 é representada a relação do estresse oxidativo com a toxicidade após a exposição a nanomateriais:

Fig. 16- A exposição a Nanomateriais e sua relação com estresse oxidativo e toxicidade.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Para a avaliação das características toxicológicas, os pesquisadores têm observado o potencial tóxico de produtos nanoencapsulados, através da medição da atividade de enzimas como GST e dos níveis de peroxidação lipídica. Por exemplo, em pesquisa de SIDDIQUE *et al.* (2015) comparando ZnO NPs Cu e CuSO₄ relacionou maior atividade da GST com a toxicidade. Inclusive, o uso de nanomateriais, como reportado por AGARRAYUA *et al.* (2022) com NCP80 demonstrou em *C. elegans* maiores níveis de expressão de SOD-3 com a cepa CF1553 no grupo que recebeu 150 µL de NCP80.

Esse sistema antioxidante atuante é de suma importância para a *Drosophila*, uma vez que seu aumento ou menor atividade também implicam em sua longevidade (LEBOURG, 2001). Assim, o estresse oxidativo desempenha um papel importante na toxicidade, conforme foi reportado anteriormente com diversos xenobióticos (WANG *et al.*, 2022).

3.JUSTIFICATIVA

Na formulação das nanocápsulas poliméricas podem ser empregados revestimentos provenientes de polímeros, os quais abrangem uma série de produtos na nanotecnologia. Esses produtos são formulados para utilização em sistemas vivos, principalmente quando envolve a nanoencapsulação de fármacos para a terapia de patologias. Os organismos vivos podem apresentar efeitos frente a exposição de nanocápsulas, sendo de suma importância estabelecer o perfil toxicológico desses revestimentos poliméricos extensamente utilizados na nanoencapsulação. Nessa questão ainda é essencial compreender os aspectos de nanosseguurança antes de sua administração em humanos.

Adicionalmente, em proposta ao melhoramento de agentes farmacológicos com a nanoencapsulação da colchicina para tratamento de doenças como a Covid-19, essa pesquisa também relacionou a nanosseguurança da forma nanoencapsulada avaliando os parâmetros do estresse oxidativo em diferentes concentrações, comparando a colchicina em forma livre. Com base nos achados desse estudo, espera-se trazer relevância ao modelo experimental da *Drosophila* como aliado para ensaios de toxicidade, corroborando com demais pesquisas envolvendo a nanotoxicidade de revestimentos poliméricos e sobre a colchicina nanoencapsulada na terapia contra a Covid-19 ou outras doenças.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Averiguar os efeitos de nanocápsulas com diferentes revestimentos poliméricos, colchicina livre (COL) e de nanocápsulas de colchicina (NCCOL) sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em *D. melanogaster*.

4.2 Objetivos específicos

Manuscrito 1

Mensurar os efeitos da exposição crônica a nanocápsulas brancas (NCBRs) com os revestimentos poliméricos de Polissorbato 80 (NCP80), polietilenoglicol (NCPEG), Quitosana (NCCS) e Eudragit (NCEUD) na taxa de sobrevivência em moscas adultas *D. melanogaster*.

Analisar diferentes concentrações de NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD na ocorrência de alterações locomotoras em *D. melanogaster*.

Averiguar a exposição crônica a 10, 50, 100 e 500 µL de NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD no estresse oxidativo envolvendo a geração de RS, TBARS, atividade enzimática da CAT, SOD e GST em *D. melanogaster*.

Comparar a exposição crônica a NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD na atividade da enzima da AChE em moscas adultas.

Avaliar a viabilidade celular de moscas *D. melanogaster* após exposição crônica a NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD.

Elucidar os efeitos de diferentes concentrações de quatro revestimentos poliméricos usados em nanotecnologia a fim de compreender sua toxicidade após períodos de exposição prolongados.

Artigo 1

Comparar os efeitos de COL, NCCOL sobre a taxa de sobrevivência em moscas adultas *D. melanogaster* na exposição aguda e crônica.

Compreender as consequências da exposição aguda e crônica a diferentes concentrações de COL, NCCOL no desempenho locomotor de *D. melanogaster*.

Analisar os marcadores de estresse oxidativo e estado antioxidante como a geração de espécies reativas (RS), níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade enzimática da Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) em moscas expostas de forma aguda e crônica a COL e NCCOL.

Mensurar o estado redox através dos níveis de tióis proteicos (PSH) e não proteicos (NPSH) em *D. melanogaster* expostas a diferentes concentrações de COL e NCCOL.

Determinar se a COL e NCCOL afetam o sistema colinérgico de forma aguda e crônica através da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em *D. melanogaster*.

Avaliar o potencial citotóxico de diferentes concentrações de COL e NCCOL na viabilidade celular de moscas *D. melanogaster* após administração aguda e crônica.

Comparar os efeitos causados por COL e NCCOL e estabelecer concentrações para pesquisas posteriores envolvendo a nanoencapsulação da COL no tratamento da Covid-19 e outras patologias.

5.RESULTADOS

Os resultados que constituem essa tese estão apresentados sob a forma de manuscrito e artigo científico, contemplando Itens como Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

5.1 Manuscrito 1:

A apresentação dos resultados e demais itens no Manuscrito 1 estão formatados de acordo com as normas para submissão na Revista científica *Chemico-Biological Interactions*- ISSN 0009-2797 – Elsevier.

5.2 Artigo científico 1: Relationship between toxicity and oxidative stress of the nanoencapsulated colchicine in a model of *Drosophila melanogaster*

Artigo publicado na Revista *Free Radical Research*.

5.2 Manuscrito 1

Toxicological analysis of chronic exposure to polymeric nanocapsules with different coatings in *Drosophila melanogaster*

^a Machado, Franciéle Romero; ^a Bortolotto, Vandrezza Cardoso; ^a Araujo, Stéfani Machado Araujo; ^a Dahleh, Mustafa Munir Mustafa Dahleh, ^a Fernandes, Eliana Jardim; ^a Musachio, Elize Aparecida Santos; ^b Funguetto, Ana Cláudia Ribeiro; ^b Haas, Sandra Elisa; ^a Guerra, Gustavo Petri; ^a Prigol, Marina; ^a Boeira, Silvana Peterini

^a Laboratory of Pharmacological and Toxicological Evaluations Applied to Bioactives

Molecules - LaftamBio, Federal University of Pampa, Itaqui, RS, 97650-000, Brazil.

^b Pharmacology Laboratory- LABFAR, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, 22 97650-970, Brazil.

*Corresponding author:

Dr. Silvana Peterini Boeira

Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui

Rua Luiz Joaquim de Sá Brito - Promorar, Itaqui, RS, 97650-000

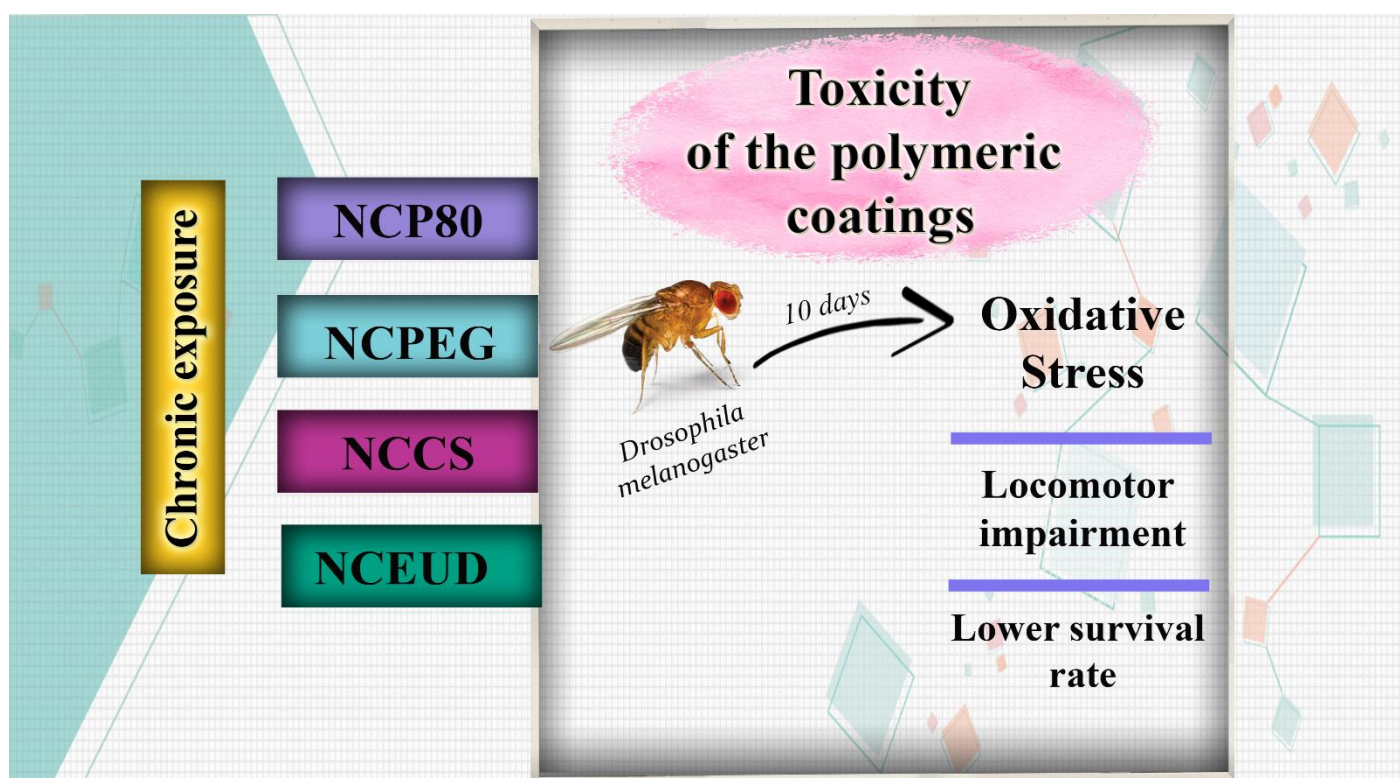
Brazil +55 559642 8174

silvanaboeira@unipampa.edu.br

Highlights

- Coatings used in polymeric nanocapsules can affect the antioxidant system.
- *Drosophila* as a living organism to unravel the toxicity of nanomaterials.
- Out of 4 polymers used in polymeric coatings, NCP80 was safer in higher quantities.
- NCEUD demonstrated several alterations related to oxidative stress parameters.

Graphical Abstract



Abstract

Nanotechnology involves the use of different nanomaterials, including polymeric nanocapsules (NCs) that are important drug carriers. To modify the release and stability of drugs, nanoformulations can have different types of polymers as surface coatings: Polysorbate 80 (P80), Polyethylene glycol (PEG), Chitosan (CS) and Eudragit (EUD). Although nanoencapsulation aims at better targeting and reducing drug side effects, polymers can interact with living organisms causing events to the antioxidant system. *Drosophila melanogaster* model has been widely used in research to characterize the toxicological response to substances. So far, little has been described about the impacts of chronic exposure to these polymers *in vivo*, even though they are widely used in nanoformulations. This study analyzes the effects of chronic exposure to polymeric NCs with different coatings in *Drosophila*. Flies (3-4 days old) were exposed to a standard food medium with 10, 50, 100, and 500 μ L of NCP80, NCPEG, NCCS, or EUD. During exposure, the survival rate was measured, while after 10-days of exposure the locomotor changes, markers of oxidative stress, and cell viability were evaluated. Among the four investigated coatings, NCP80 had little effect on the measured parameters, because only in 500 μ L increased the time of negative geotaxis and TBARS levels. However, NCEUD significantly impacted the number of dead flies, reactive species, and activities of Catalase and Superoxide dismutase enzymes even in smaller amounts from 100 μ L, affecting significantly after chronic exposure. In part, the toxicity mechanisms of these coatings can be explained by the imbalance of the antioxidant system, causing higher mortality in flies. This research provided initial evidence on the toxicology of these nanomaterials in *Drosophila* at higher concentrations and chronically, to clarify which polymers may be safer in chronic administration for future nanoformulations. It should

be noted that further investigations in the future are essential to clarify possible biochemical pathways involved in the toxicity of these polymeric coatings.

Keywords: polymeric nanocapsules; toxicity; oxidative stress; behavior.

1. INTRODUCTION

The expansion of nanotechnology is one of the most promising technologies of the 21st century, as it is based on nanoscience theories to include nanoscale applications [1]. Development in this area dates to the 1970s with liposome-based delivery proposed by Gregoriadis *et al.* [2]. New technologies involving polymer-based nanoparticle carriers have continually emerged, such as polymeric micelles, dendrimers, polymersomes and polymeric nanoparticles [3-4].

In the short and medium term, the emergence of new applications is expected in drug delivery because although inorganic and organic technologies are under development, the use of controlled-release polymers and liposomes still has a clinical impact [5] (Ferrari, 2005). The modulation of pharmacological characteristics is a fundamental aspect of drug delivery systems. Thus, it is possible to achieve certain factors such as better delivery of water-soluble drugs, specific targeting of the drug to cells and tissues, use of combination therapy, and the delivery of large macromolecules to intracellular sites of action [5-6].

In nanomaterials, surface coatings are employed in the formulation of uncharged polymeric nanocapsules (NCs), within which are included nanocapsules coated with polymers polysorbate 80 (P80), polyethylene glycol (PEG), chitosan (CS) and Eudragit (EU), among others. Polymeric coatings are recognized as a viable way to control cellular responses, such as adhesion, proliferation and differentiation [7]. It is noteworthy that these coatings can modify the reactivity of the particle, in which factors such as the

surface electrical charge (positive or negative charge) influence the interaction with subsystems or biological membranes [9]. For example, negatively charged surfaces will be attracted to positively charged surfaces and vice versa, in which positively charged surfaces can present toxicity, damage the cell membrane and interact with proteins, enzymes and DNA, culminating in genotoxicity [10-11].

Between polymers, Polysorbate 80 (also known as Tween 80) is a synthetic nonionic surfactant, chemically composed of polyoxyethylene sorbitan, predominantly oleic acid and other fatty acids such as palmitic or linoleic acid [12]. (Schwartzberg & Navari, 2018). Its main component is polyoxyethylene-20-sorbitan monooleate, with structural similarity to polyethylene glycols [13]. While polyethylene glycol (PEG) used in pharmaceutical formulations, it refers to polyethylene oxide oligomers with different molecular weights [14]. PEG has shown to increase circulation time for liposomes and polymeric nanoparticles, in addition to being approved by the Food and Drug Administration (FDA) for drug delivery applications mainly in nanoparticle (NP) formulations with Doxil® and Onivyde® [15-16]. It is even discussed that NPs modified with PEG have higher serum stability, are more biocompatible and denote opportune physicochemical behavior [16].

Among the most abundant polysaccharides is chitosan (CS), produced by the deacetylation of chitin, which is biodegradable and non-toxic. This natural polymer has the proven characteristics of being biodegradable and biocompatible, composed of glucosamine and N-acetylglucosamine units [17-18]. The presence of free hydroxyl and amino groups allows NPs to bind to various chemical groups to facilitate processes such as protein adsorption and targeted delivery of substances [19].

Finally, Eudragit® polymers have been used for the conception and delivery of therapies to specific sites via the oral route, in addition to showing good aptitude for

topical and ophthalmic delivery. Its potential in the formulations of conventional systems is distinct for the efficient targeting of drugs. Eudragit is acquired synthetically from esters of acrylic and methacrylic acids [20]. According to Kriplani & Guarve [21], it has the potential as a polymer for drug release control as a coating polymer and matrix formation in various delivery systems. It is said to increase drug bioavailability and minimize side effects. Finally, the positive charges of EUD can neutralize the negative charges of DNA, crossing the cell membrane without causing damage to molecules [22].

The use of higher doses of nanomaterials can lead to the induction of oxidative stress, which to investigate this exposure in models such as mammals *in vivo* involves ethical issues. On the other hand, *Drosophila* does not imply ethical impasses, making it suitable for research in nanotoxicology [23]. According to Schins & Knaapen [24], reactive oxygen species (ROS) are related to the genotoxicity of nanoparticles, surface properties, presence of transition metals and lipid peroxidation. In the evaluation of nanosecurity, even if *in vitro* tests are more accessible, human health is more related to *in vivo* tests [25]. In fact, most drugs are administered orally, making it essential to analyze the impact of oral administration of these nanocarriers in *in vivo* models.

In the nanotechnological scenario of the constant development of new products, it is necessary to evaluate how polymers can exert different biological responses in chronic exposure. In this way, we inserted high amounts in the *Drosophila* food, verifying the aspects of oxidative stress. Finally, it is expected to demonstrate that polymeric coatings can be widely used safely in living organisms.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Reagents

The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), Thiobarbituric acid (TBA), 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide (01480, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide (Resazurin), (–)-Epinephrine (E4250), (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide) (MTT) and 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES). Other reagents used are available from the Laboratory Laftambio Pampa, Campus UNIPAMPA, Itaqui.

2.2 Synthesis of nanocapsules

2.2.1 Chemical and Reagents

Poly-(ϵ -caprolactone) (PCL), capric/caprylic triglycerides (TCM), Lipoid® S45, Polysorbate 80 (P80), Polyethylene glycol 4000 (PEG), Eudragit ®RS 100 (EUD) and chitosan (medium molecular weight, 85.7 deacetylation degree) were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil). Acetone was pharmaceutical grade. Ultra-purified water was prepared using a Milli-Q Millipore system (Bedford, USA).

2.2.2 Preparation of Nanocapsules

The obtaining of polymeric nanocapsules occurred through the preformed polymer method [26]. In summary, the organic phase of NCP80, NCPEG and NCCS was composed of PCL, TCM, Lipoid® S45 and acetone. While the organic phase of NCEUD was composed of EUD, TCM and acetone. For the aqueous phase of all nanocapsules Milli-Q water and P80 were used, however for NCPEG the PEG was added. Sequentially,

the organic phase was maintained under magnetic stirring, with heating until the complete solubilization of the constituents occurred, and poured onto the aqueous phase with the aid of a syringe. The resulting suspension was stirred at room temperature in order to form the nanoparticles and evaporated under reduced pressure (model R-210/215, BÜCHI®) to completely remove the acetone and partially remove the water. For NCCS, an additional step was used, consisting of the addition of 0.5% CS solution under magnetic stirring. As for the number of particles for each NC, these were analyzed using the turbidimetry technique, using a UV spectrophotometer (UV 1800, Shimadzu®) [27].

Table 1. Pipetted volumes and their particle concentration based on N ($\times 10^{10}$ particles. mL-1)

Volume	NCP80	NCPEG	NCCS	NCEUD
N ($\times 10^{10}$ particles. mL-1)	5.6	7.6	3.1	4.7
10 μ L	0.056×10^{10}	0.076×10^{10}	0.031×10^{10}	0.047×10^{10}
50 μ L	0.28×10^{10}	0.38×10^{10}	0.155×10^{10}	0.235×10^{10}
100 μ L	0.56×10^{10}	0.76×10^{10}	0.31×10^{10}	0.47×10^{10}
500 μ L	2.8×10^{10}	3.8×10^{10}	1.55×10^{10}	2.35×10^{10}

2.3 *Drosophila* culture

Drosophila melanogaster (Harwich strain) flies of both sexes from Laftambio Pampa (Federal University of Pampa, Itaqui, Brazil) were maintained under standardized conditions. As standard, 12-hour light/dark cycle, temperature (25 ± 1 °C), humidity between 60-70%, and a standard research group feed (76.59% corn flour, 8.51% wheat germ, 7.53% sugar, 7.23 % powdered milk, 0.43% of salt and 0.08% of nipagin).

2.4 Experimental design

Drosophila melanogaster (1-4 days) were chronically exposed (10 days) to nanocapsules (NCs) with different coatings, to assess their toxicity without the presence of drugs. Each NC was classified as follows: NCP80 (Nanocapsules coated with Polysorbate 80), NCPEG (Nanocapsules coated with Polyethylene glycol), NCCS (Nanocapsules coated with Chitosan) and NCEUD (Nanocapsules coated with Eudragit®RS100). The nanocapsules were synthesized and obtained for testing with *Drosophila* through a partnership with the Pharmacology Laboratory (LABFAR; Unipampa-Campus Uruguaiana). Each NC was added in its original form to the *Drosophila* food in the respective amounts of 10, 50, 100 and 500 µL to the standard 5 mL food medium (Figure 1).

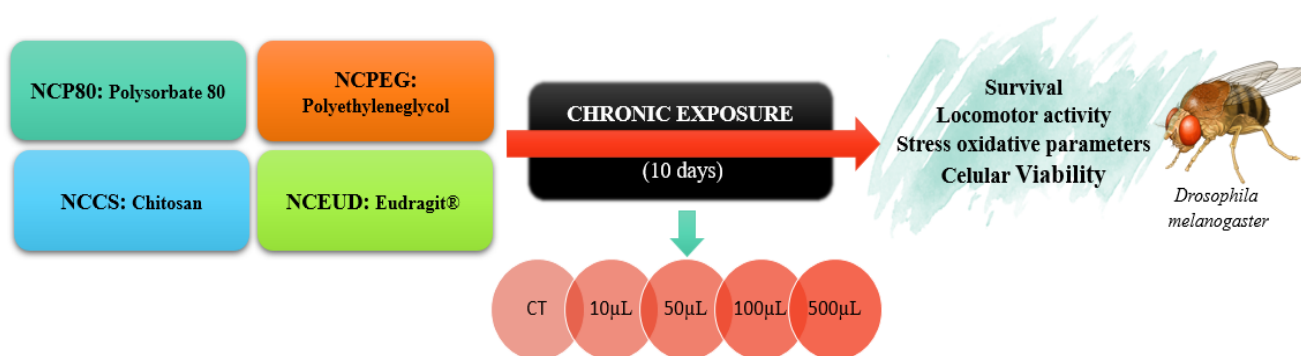


Figure 1. Description of the experimental design for evaluating the toxicity of NCs with different polymeric coatings.

Periodically, the food medium was replaced by a new medium to ensure a constant supply of each NC. In addition, from the 1st to the last day of the experiment, the survival of all experimental groups was recorded. At the end of chronic exposure, behavioral tests and biochemical tests were conducted.

2.5 In vivo assays

2.5.1 Survival rate

To obtain the survival rate, the total number of flies that survived (1st to 10th day) were counted daily in each group to characterize the concentrations of each NC and the effects on *Drosophila* survival. Initially, a total of 50 flies were separated for each experimental group, using data from 6 independent experiments (n=6) totaling 300 flies (per group) [28].

2.5.2 Open Field

The conduction of tests to verify the presence of deficiencies in the locomotion of the fly was carried out as described by Hirth [29]. For this test, Petri dishes marked with quadrants (1 cm) were used. The total number of quadrants traversed by each fly for 60 seconds was counted and the control group compared to all NCs. Five independent experiments were conducted (5 flies, with a total of 25 flies per group).

2.5.3 Negative geotaxis

The protocol was conducted as proposed by Jimenez Del-Rio *et al.* [30], recording the climbing time of each fly to reach the 8 cm marked in falcon tubes (15 cm long and 1.5 cm in diameter). The test was repeated 5x with each fly. A total of 5 independent experiments were conducted with 5 flies per group, for a total of 25 flies.

2.6 Ex vivo assays

2.6.1 Homogenization of tissue for biochemical assays

For sample preparation, a total of 12 flies were homogenized in 600 μ L of 20 mM buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (HEPES), pH 7.0, and centrifuged at 95 x g for 10 min (4°C). With the exception of samples for measuring reactive species and resazurin, a centrifugation protocol of 1213 x g for 5 min and 10 min, respectively, was followed. The supernatant obtained by the centrifugation process was separated for biochemical analyses.

2.6.2 Evaluation of the lipid peroxidation

To quantify lipid peroxidation, the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was measured, as described by Ohkawa *et al.* [31]. For this assay, reagents such as thiobarbituric acid (0.8%; pH 3.2), acetic acid/hydrochloric acid (HCl) (20%, pH 3.5) and sodium dodecyl sulfate (SDS 8.1%) were employed in the methodology. Subsequently, the samples were incubated for 2 hours at a temperature of 95°C. After the incubation time, in the microplate reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) the absorbance was measured at 532 nm. These values were normalized with protein concentration to obtain levels in nmol of malondialdehyde (MDA) / mg of protein). In the results, these levels were expressed in percentage compared to the control group (% of the control of 5 independent experiments/60 flies for each group).

2.6.3 Reactive Species Levels (RS)

The methodology used for this analysis followed Pérez-Severiano *et al.* [32], in which the fluorescence of the compound 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) is quantified to determine the level of reactive species (RS). After sample preparation and addition of DCF-DA, they were incubated for 1 hour. RS levels were obtained using the

Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer (Agilent Technologies) with excitation length of 488 nm and emission of 530 nm. The percentage of the control group was used as a standard for comparison with all groups exposed to each coating (% control from 5 independent experiments / 35 flies per group).

2.6.4 Measurement of acetylcholinesterase (AChE) activity

In the protocol to measure enzyme activity according to the methodology described by Ellman *et al.* [33] the following reagents used: potassium phosphate buffer (0.25 M KPi, pH 8.0) and 5 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). From the addition of the sample supernatant and acetylthiocholine (ASCh) 7.25 mM, the enzyme reaction is initiated, being measured during 120 seconds at 412 nm with values expressed in $\mu\text{mol ASCh} / \text{h} / \text{mg}$ of protein. Results were obtained from 5 independent experiments/60 flies for each group.

2.6.5 Determination of Superoxide Dismutase (SOD) activity

According to the protocol by Misra & Fridovich [34] and Sun & Zigman [35], based on the inhibition of epinephrine autoxidation, SOD activity can be determined. For measurement, reagents such as sodium carbonate buffer (57.7 mM) at a constant temperature of 30°C and epinephrine solution (6 mM) are added to the supernatant of the samples to visualize the activity of this enzyme. The enzymatic activity evaluates the formation of adrenochrome at a wavelength of 480 nm for 120 seconds using a microplate reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). In the end, the data obtained were expressed in the results as IU/protein (5 independent experiments/60 flies for each group).

2.6.6 Measurement of the catalase (CAT) activity

The methodology for analyzing the catalase enzyme activity, with few modifications, was as described by Aebi [36]. The reagents were added together: 0.25 M potassium phosphate buffer solution (KPi / EDTA (2.5 mM, pH 7.0), Triton® X-100, and hydrogen peroxide (H₂O₂) at a concentration of 30%. Finally, the *Drosophila* samples were mixed with the reagents and immediately read at 240 nm for 1 min (5 independent experiments/60 flies for each group).

2.6.7 Enzymatic activity of the Glutathione S-Transferase (GST)

To detect the enzymatic activity of GST, the method according to Habig *et al.* [37], presenting some modifications. As experimental procedures, the following reagents were used: 0.25 M potassium phosphate/EDTA buffer (2.5 mM, pH 7.0), distilled water and 100 mM glutathione (GSH). Sequentially, the supernatant of the samples is added and then the substrate 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (50 mM CDNB) to start the enzymatic reaction at 340 nm for 2 min. Results were expressed as CDNB-conjugated nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ from 5 independent experiments/60 flies for each group.

2.6.8 Cell viability for Resazurin reduction test

Resazurin reduction is one of the methods proposed by Brien *et al.* [38] to analyze cell viability through the formation of resorufin, fluorescent pink in color, quantifying the intensity of the color that is proportional to the number of living cells in a sample. With the buffer and the supernatant of the sample mixed, the resazurin solution (0.2 mg/mL) was added and incubated for 1 hour in the dark. After incubation, reading was performed in a microplate reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate

Spectrophotometer) at 573 nm. In the results, the values obtained were expressed in percentage to the control group.

2.7 Protein determination

Protein concentrations for the samples were obtained as described by Bradford using the Coomassie Brilliant Blue G-250 and bovine serum albumin as a standard [39].

2.8 Statistic

The curves of the Mantel-Cox log-rank test were used to evaluate the survival rate, observing the statistical differences between the curves of the experimental groups. While the significance was obtained by One-way (ANOVA) through the number of dead flies. (Values from 6 independent experiments were used in the survival curve and in the evaluation of the number of dead flies). For the other analyses, behavioral and biochemical, the data were initially tested for normality (Shapiro-Wilk test) to direct the appropriate statistical test for each parameter.

Thus, for parametric data, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's test. However, for non-parametric data, the Kruskal-Wallis test was used with Dunn's post hoc test. Results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and values below $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1 Decrease in survival rate according to concentration

In chronic exposure to the different polymeric coatings, the Log-rank test (Mantel-Cox) has been shown to reduce the percentage of survival at higher concentrations, indicated by the difference in survival curves for all polymers tested ($P < 0.001$). A lower survival rate is observed principally in the 500 μL group for NCP80 ($F_{(4, 25)} = 73.93$; $P < 0.0001$) and NCPEG ($F_{(4, 25)} = 20.65$; $P < 0.0001$) (Fig.2A and B).

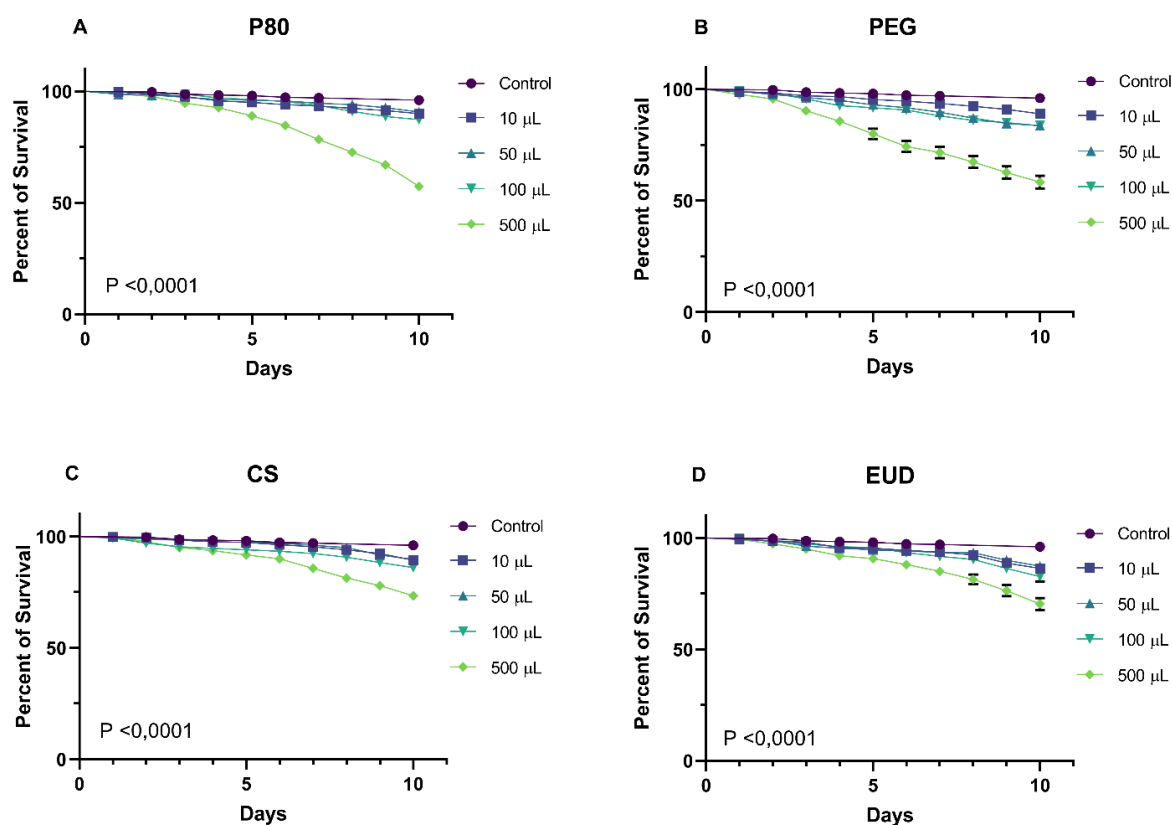


Fig. 2. Survival rate of *Drosophila melanogaster* chronically exposed to white nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D). Data were collected every 24 hours for 10-days (chronic exposure). Total of 6 independent experiments representing a total of 600 flies per group. Survival rate was evaluated using Mantel-Cox log-rank test curves.

To assess the difference in mortality between groups from 10 to 500 μL , the number of dead flies was included. For NCP80 (Fig.3A; $F_{(4, 25)} = 73.93$; $P < 0.0001$) and NCEUD (Fig.3D; $F_{(4, 25)} = 11.07$; $P < 0.0001$) there was a significant increase in the 100 μL and 500 μL groups compared to the control, while for NCPEG (Fig.3B; $F_{(4, 25)} = 20.65$; $P < 0.0001$) and NCCS (Fig.3C; $F_{(4, 25)} = 9.441$; $P < 0.0001$) only in the highest amount in 500 μL that mortality was pronounced. Indicates that even in the 100 μL groups, P80 and EUD were harmful to the survival of the flies.

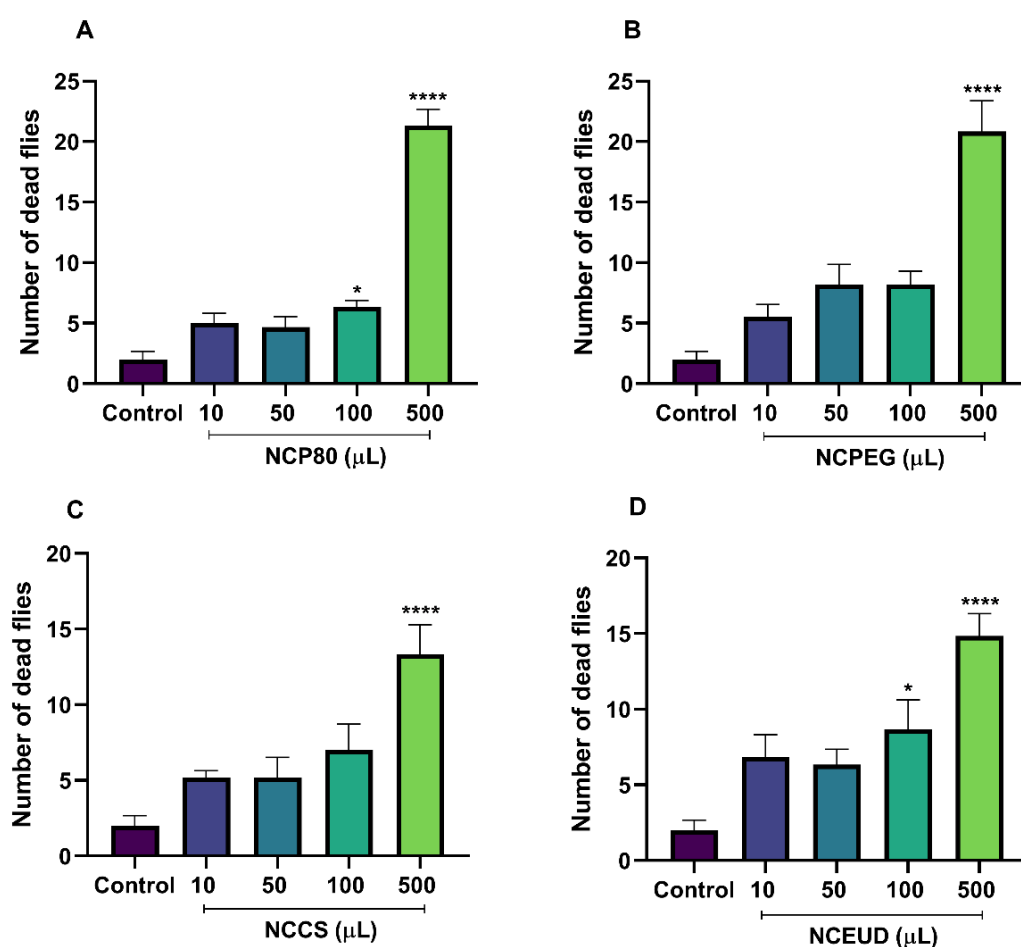


Fig. 3. Effect of different concentrations of nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D) on mortality in chronic exposure (number of flies killed). Data were collected every 24 hours for 10-days. Significance performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments). Statistical significance versus control was expressed as * $p \leq 0.05$ and **** $p \leq 0.0001$.

3.2 Open field test showed locomotor impairment in NCEUD

The presence of alterations in the locomotor activity of flies can predict aspects of toxicity of certain substances in experimental protocols of longer duration. Polymers used in nanotechnology coatings as NCP80 ($F_{(4, 20)} = 1.011$; $P=0.4254$), NCPEG (P value=0.2489) and NCCS ($F_{(4, 20)} = 0.2733$; $P=0.8917$) (Fig.4 A-C) did not affect the number of crossings in the open field test compared to the control at any of the concentrations.

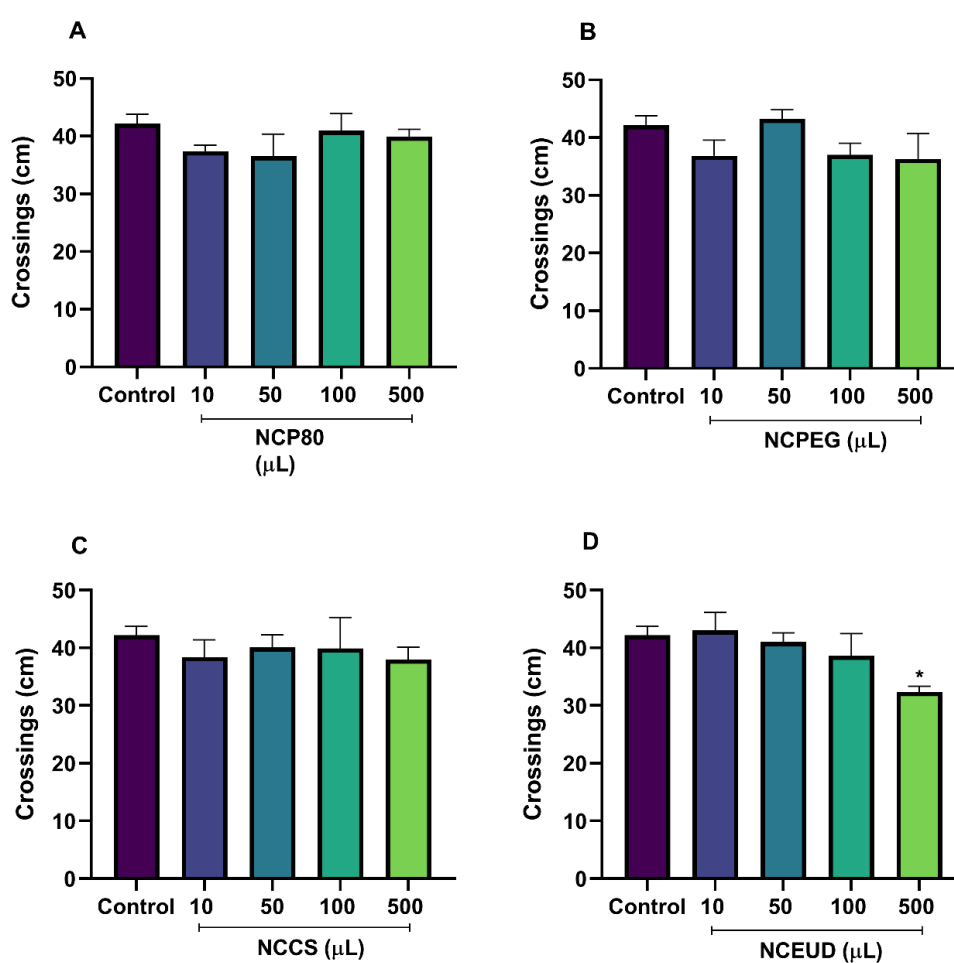


Fig.4. Evaluation of locomotor performance by open field test after chronic exposure to nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D) in *Drosophila melanogaster*. Values obtained from 6 independent experiments = 5 flies per group/treatment. Data were used from 6 independent experiments containing 5 flies (total of 30 flies per group). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups (A,C). Data identified as non-parametric; the Kruskal-Wallis test was performed (B, D).

Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 5 independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

However, the significant decrease in crossings for the group exposed to 500 μ L of NCEUD (P value= 0.0302) in relation to the control is evident. Still, it is clear that most of the tested coatings were safe even in high amounts such as 500 μ L in the 5 mL food medium.

3.3 P80 caused an increase in climbing time in negative geotaxis

As for the climbing activity evaluated by the negative geotaxis test, only the NCP80 showed significantly longer climbing time in the 500 μ L group compared to the control. The other 10 μ L, 50 μ L, and 100 μ L groups did not express any significant change in relation to the control (Fig.5A; $F_{(4, 20)} = 6.754$; $P=0.0013$).

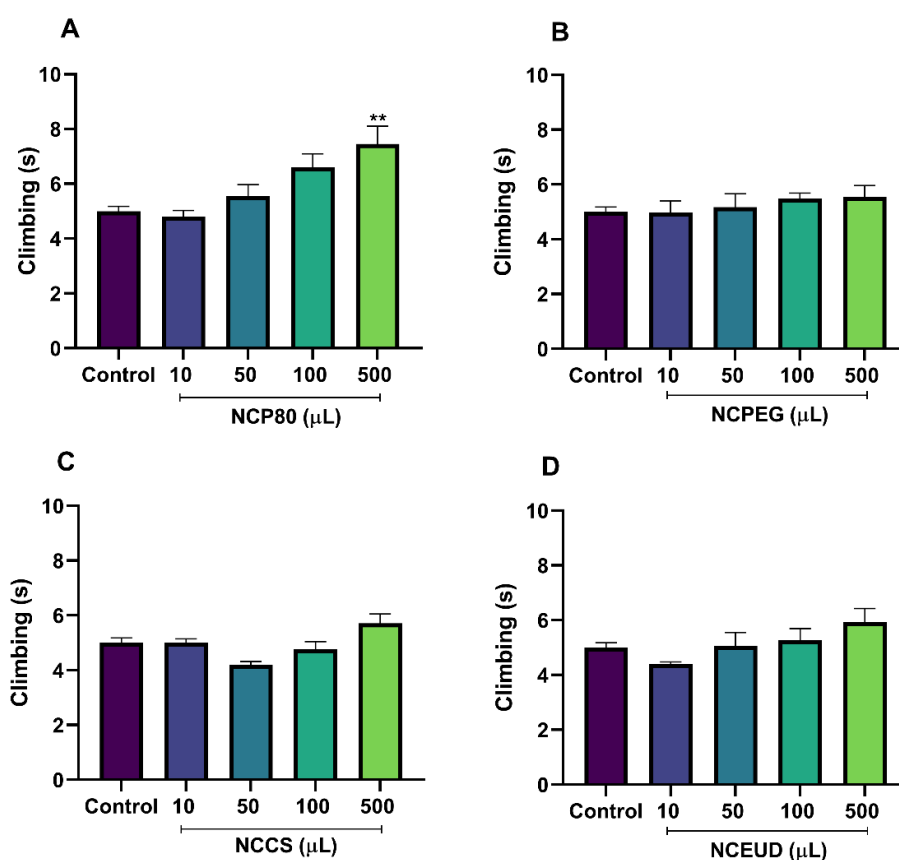


Fig.5. Effects of chronic exposure to nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C), and Eudragit (D) on negative geotaxis test in *Drosophila melanogaster*. Values obtained from 6 independent experiments = 5 flies per group/treatment. Data were used from 6 independent experiments containing 5 flies (total of 30 flies per group). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups (A, B). Data identified as non-parametric; the Kruskal-Wallis test was performed (C-D). Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 5 independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

While for NCPEG (Fig.5B; $F_{(4, 20)} = 0.5244$; $P=0.7190$), NCCS (Fig.5C; P value =0.0130) and NCEUD (Fig.5D; P value=0.0470) did not show any significant result in the climbing time of the flies.

3.4 Among the coatings, only P80 raised TBARS levels in the 500 μ L group

Chronic exposure caused lipid peroxidation, which occurred significantly in the 500 μ L group of nanocapsules coated with P80. This group showed increased levels of TBARS compared to the control, as shown in Fig.6A ($F_{(4, 25)} = 8.470$; $P=0.0002$).

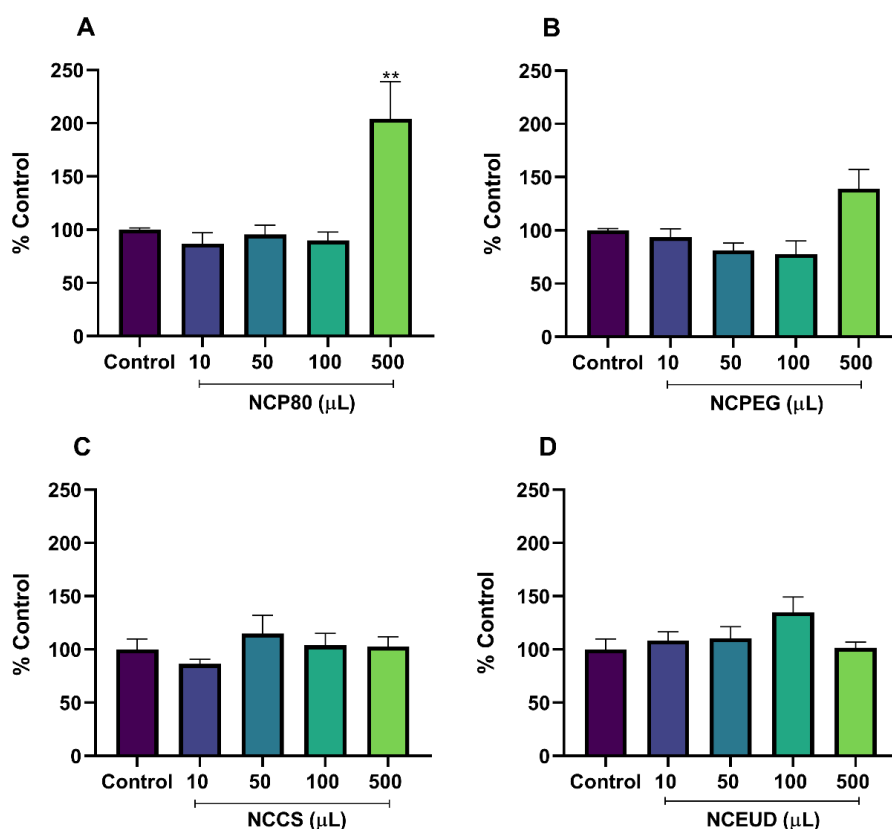


Fig. 6 Assessment of chronic exposure a 10, 50, 100 e 500 μ L of nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C), and Eudragit (D) in lipid peroxidation through the generation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in *Drosophila*. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups. Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 6 independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

The smaller amounts that were used did not cause any alteration, not even the other target coatings of this research affected TBARS levels in chronic exposure for 10 days, guaranteeing its safety even in higher concentrations of NCPEG (Fig.6B; $F_{(4, 25)} = 5.169$; $P=0.0036$), NCCS (Fig.6C; $F_{(4, 25)} = 0.8183$; $P=0,5256$) and NCEUD (Fig.6D; $F_{(4, 25)} = 1.883$; $P=0.1448$).

3.5 NCP80 did not alter the levels of reactive species

As can be seen in Figure 7, a higher generation of RS was significant for the 100 μ L concentrations of NCCS (Fig.7C; $F_{(4, 15)} = 6.799$; $P=0.0025$), and NCEUD (Fig.7D; $F_{(4, 20)} = 3.947$; $P=0.0161$), compared to the control. While NCPEG (Fig.7B; $P=0.0113$), and NCEUD, the 500 μ L groups, also showed an increase in RS levels, respectively.

From the concentration of 100 μ L of NCCs, there was no increase in these levels although a dose-dependent increase is expected, with the exception of NCEUD in the 500 μ L. However, NCP80 did not represent significant changes in RS levels compared to the control (Fig.7A; $F_{(4, 20)} = 2.455$ $P=0.0791$).

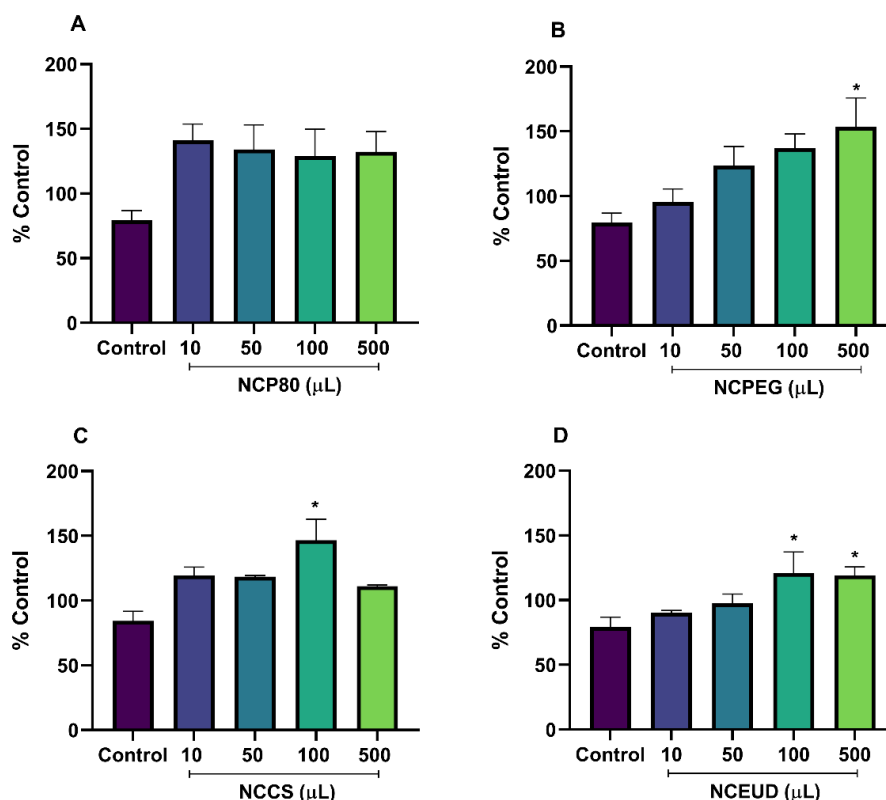


Fig. 7. Evaluation of reactive species (RS) levels in *Drosophila* flies exposed for 10-days to polymeric nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C), and Eudragit (D). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups (A, C, D). Data were identified as non-parametric; the Kruskal-Wallis test was performed (B). Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 5$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

3.6 NCCS causes inhibition of AChE activity in higher concentration

Chronic exposure to P80-coated nanocapsules (Fig.8A; $F_{(4, 25)} = 1.131$; $P=0.3644$), NCPEG (Fig.8B; $F_{(4, 25)} = 0.4841$; $P=0.7472$) and NCEUD (Fig.8D; $F_{(4, 25)} = 5.478$; $P=0.0026$) did not cause any change in AChE enzymatic activity at any of the four concentrations tested.

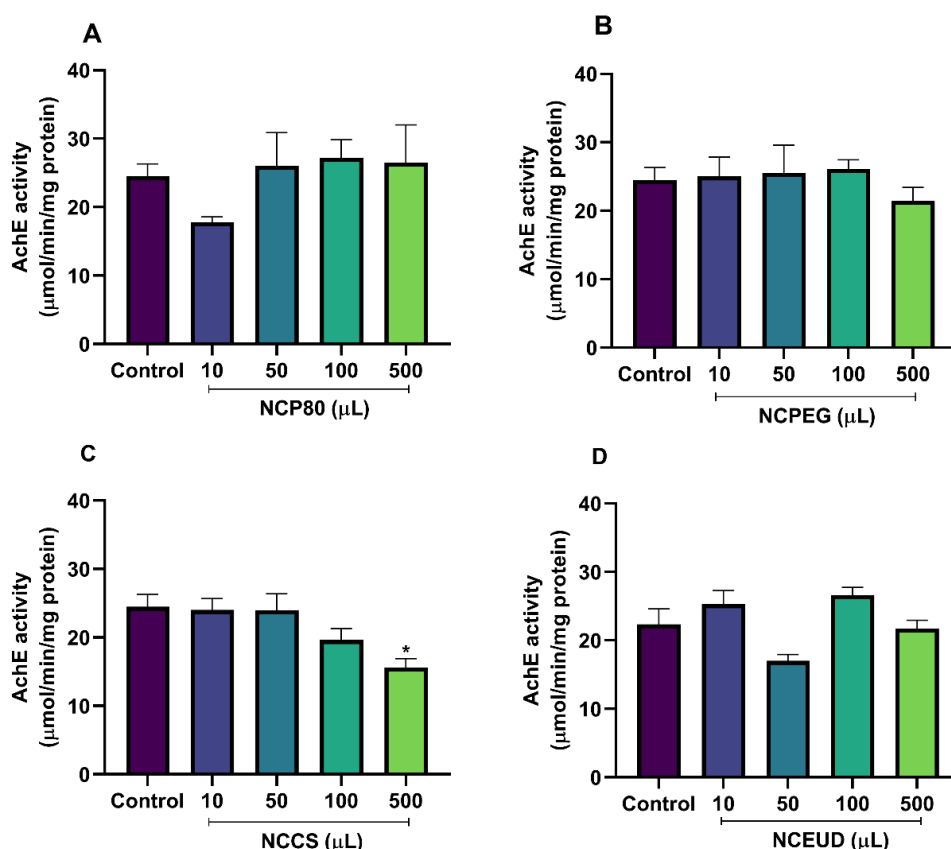


Fig. 8. Effects of chronic exposure to 10, 50, 100 and 500 μL of nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D) on acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity in *Drosophila*. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

However, a significant decrease in AChE activity occurred in the NCCS (Fig.8C; $F_{(4, 25)} = 4.533$; $P=0.0068$) in the 500 μL group, demonstrating an anticholinesterase action of NCCS in chronically exposed flies.

3.7 SOD activity is altered at different concentrations

Alterations in SOD enzymatic activity are involved in aspects of oxidative stress. In the exposure for 10-days, NCP80 (Fig.9A; $F_{(4, 20)} = 1.227$; $P=0.3310$) and NCPEG (Fig.9B; $F_{(4, 20)} = 1.887$; $P=0.1521$) did not result in any significant change in the enzymatic activity of this enzyme compared to the control, as shown in figure 9.

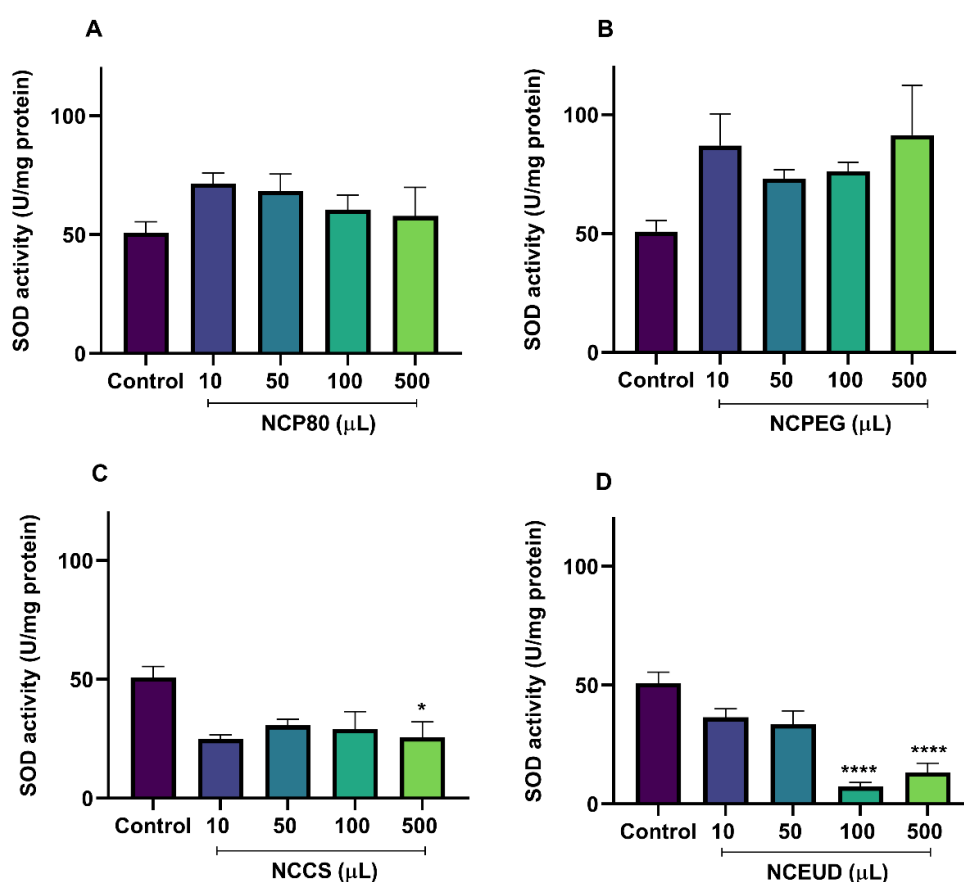


Fig. 9. Effects of chronic exposure to 10, 50, 100 and 500 µL of nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D) on superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in *Drosophila*. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups (A, B, D). Data were identified as non-parametric; the Kruskal-Wallis test was performed (C). Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 6 independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

However, there was a significant reduction in the enzymatic activity in the NCCS polymeric coatings in the groups of 10 and 500 (Fig.9C; P value=0.0411) and NCEUD in the 100 and 500 groups (Fig.9D; $F_{(4, 20)} = 18.54$; $P < 0.0001$).

3.8 All polymeric NCs altered CAT activity, except NCP80

Drosophila chronically exposed to NCP80 (Fig.10A; $F_{(4, 25)} = 2.609$; $P = 0.0598$) showed no significant increase or decrease in CAT activity. Another fact, NCPEG in 500 μL was able to significantly increase CAT activity compared to the control (Fig.10B; $F_{(4, 25)} = 5.477$ $P = 0.0026$). Oppositely, the NCCS (Fig.10C; $F_{(4, 25)} = 3.426$; $P = 0.0230$) culminated in a decrease in CAT activity, a result observed in the 500 μL group (Fig.10C).

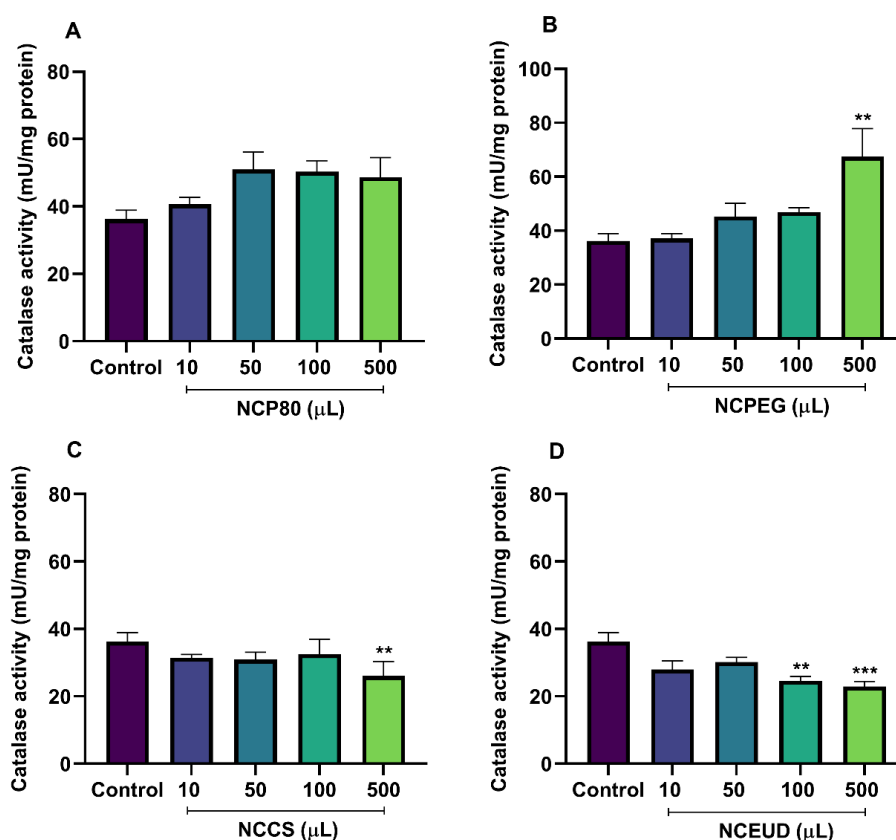


Fig. 10. Analysis of the enzymatic activity of catalase (CAT) in *Drosophila* flies chronically exposed to polymeric nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D). One-way analysis of variance

(ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups. Values are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 6 independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

Finally, NCEUD was also able to affect the activity of this enzyme involved in the enzymatic defense against oxidative stress but decreasing its activity in the 100 μ L and 500 group μ L (Fig.10D; $F_{(4, 25)} = 6.781$; $P=0.0008$).

3.9 Chronic exposure to NCPEG affect GST enzyme activity

PEG-coated NCs showed a significant increase in GST enzymatic activity at the highest concentration, that is, in the 500 μ L group compared to the control group (Fig.11B; $F_{(4, 25)} = 5.983$; $P=0.0016$). On the other hand, the NCCS in the 50 μ L group significantly decreased the activity of the GST enzyme, but in other groups, there was no difference in relation to the control (Fig.11C; $F_{(4, 25)} = 6.105$; $P=0.0014$).

Furthermore, NCP80 and NCEUD showed no statistical difference in any of the 10 μ L to 500 μ L groups compared to the control (Fig.11A; $F_{(4, 25)} = 0.7917$; $P=0.5416$) and (Fig. 11D; $F_{(4, 25)} = 2.415$; $P=0.0755$).

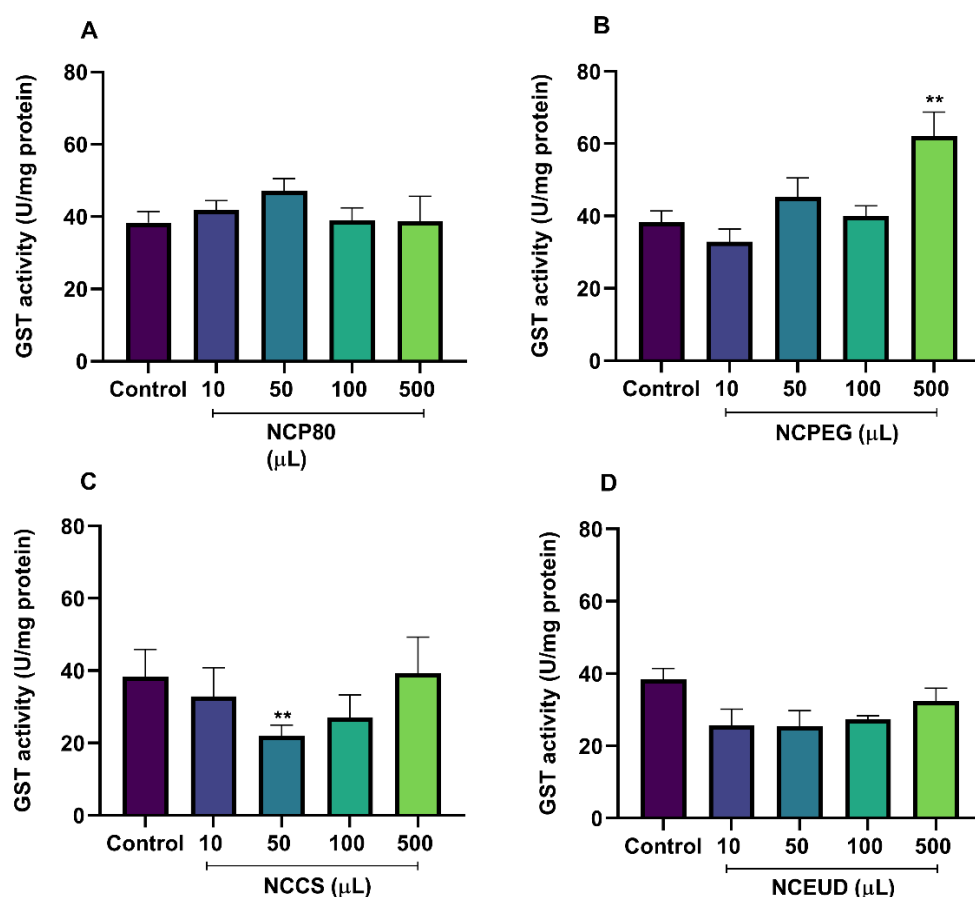


Fig.11. Assessment of the enzymatic activity of the Glutathione S-transferase (GST) in *Drosophila* flies chronically exposed to polymeric nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

3.10 Cell viability by Resazurin is not affected by chronic exposure to coatings

Analyzing cell viability through the test that measures the reduction of resazurin, no statistical change was found in all nanocapsules evaluated in this study, such as NCP80 (Fig.12A; $F_{(4, 25)} = 2,085$; $P = 0,1129$), NCPEG (Fig.12B; $F_{(4, 25)} = 1,031$; $P = 0,4108$), NCCS (Fig.12C; P value= 0.3319), and NCEUD (Fig.12D; $F_{(4, 25)} = 0.8336$; $P = 0.5166$) when compared to the control.

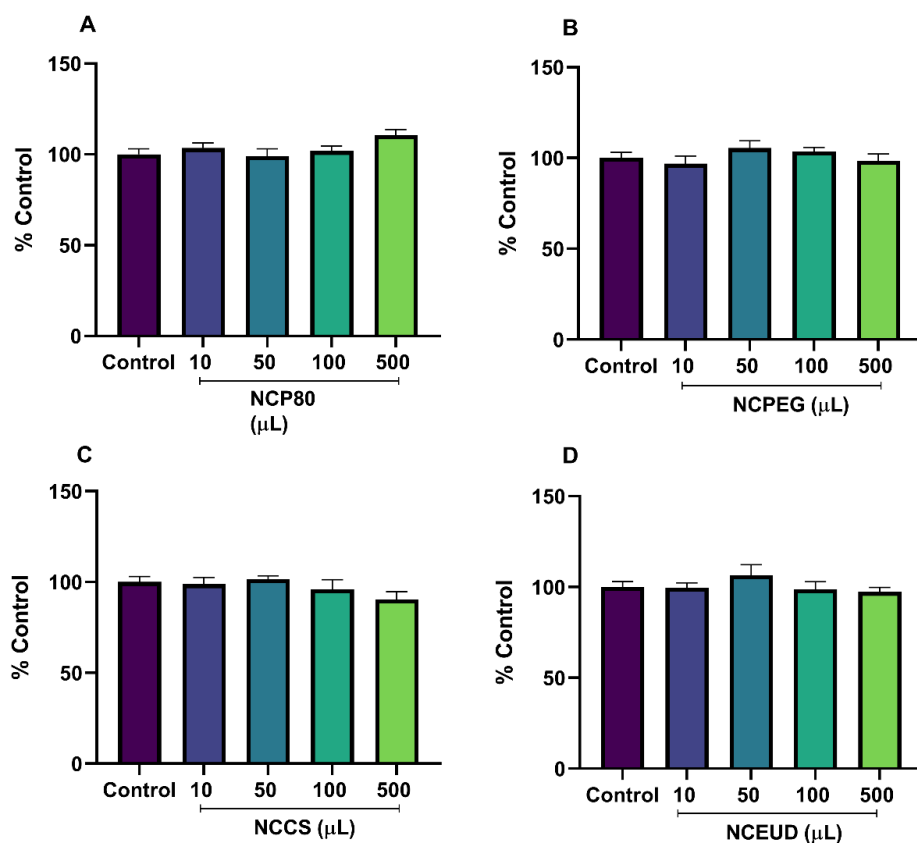


Fig. 12. Effects of chronic exposure to 10, 50, 100 and 500 μL of nanocapsules coated with Polysorbate 80 (A), Polyethylene glycol (B), Chitosan (C) and Eudragit (D) on cellular viability in *Drosophila melanogaster*. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine the level of significance between groups (A, C, D). Data were identified as non-parametric; the Kruskal-Wallis test was performed (B). Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

Thus, the coatings did not affect the cell viability of flies chronically exposed to different groups as proposed in this study.

4. Discussion

This research showed the implications of chronic exposure to different polymeric NCs on the biological functioning of *Drosophila melanogaster*. In nanotechnology, polymers such as P80, PEG, CS, and EUD are widely used, so the toxicological characterization allows understanding the effects of these nanocapsules on living organisms. High concentrations were pipetted into the food medium to induce oxidative responses, in which the 500 μL volume represented 10% of the *Drosophila* food medium.

Initially, the survival curves allow an understanding of the toxicological aspects, showing differences between concentrations. To statistically define how much the volumes, result in mortality, using a one-way ANOVA test, we observed that all NCs resulted in significant mortality, with NCPP80 and NCEUD also affecting volumes of 100 μL in chronic exposure. According to a study by Agarrayua *et al.* [40] with *Caenorhabditis elegans* the concentrations of 150 μL (NCP80), 100 μL e 150 μL (NCPEG) e 10 μL a 150 μL (NCCS) resulted in the lowest survival rate in chronic exposure. While in *Drosophila* from 100 μL of NCP80 higher mortality already occurred, in *C. elegans* only a higher concentration this phenomenon was observed. In addition, NCEUD probably exhibited a distinct pharmacodynamic profile according to the living organism. Answers between the alternative models seem to diverge, given the biological differences between these living organisms. Invertebrates such as *Galleria mellonella* larvae were used to assess the toxicity of lipid core nanocapsule formulations with different surface coatings as polysorbate 80 (neutral surface) which did not show acute toxicity effects [41].

However, in the current study, we investigated the effects of these substances over a prolonged period to answer pertinent questions about chronic exposure to these nanomaterials. We emphasize that the alternative model *Drosophila melanogaster* can be

used to screen chronic toxicity in polymeric nanocapsules. In fact, research can be developed in order to evaluate their toxicity when loaded with different substances used in the nanoformulation.

The presence of locomotor impairment was clear in the groups of 500 μ L of NCEUD with reduced crossings in the open field. While only the 500 μ L group of NCP80 showed a longer climbing time in negative geotaxis. It was expected that a similar result would be noticeable in both behavioral tests, possibly different chemical characteristics of the polymers could influence the behavioral profile of the flies in these tests. We also emphasize that positive aspects were found, as smaller volumes did not indicate locomotor toxicity, including NCPEG and NCCS as safer in these parameters even in volumes of 500 μ L. Nanoparticles constitute a pharmacological delivery system which modulates pharmacokinetic properties. For example, surface-modified polymeric nanoparticles can act on the central nervous system through the blood-brain barrier (BBB) [42].

The present study demonstrated a significant increase in TBARS levels in the 500 μ L volume of NCP80, demonstrating the involvement of this polymer in the lipid peroxidation of chronically exposed flies. According to Anderberg *et al.* [43] the compound P80 has demonstrated several pharmacodynamic properties, including changing membrane fluidity and increasing membrane permeability. These factors described above also occur in lipid peroxidation and may explain the effect of the P80 coating on raising these levels [44]. It is noteworthy that the quantification of lipid peroxidation includes reactions such as malondialdehyde and thiobarbituric acid, quantifying by absorbance the production of a chromophore [45].

Regarding P80, activation of the complement system is reported, which can cause perforation of plasma membranes related to immunological side effects such as systemic

reactions and acute hypersensitivity [46]. Previously, it was observed in vitro that polysorbate 80 was able to increase cell susceptibility to oxidative stress in rat thymocytes, due to the high cytotoxicity of hydrogen peroxide [45]. It has been described that polysorbate 80 is a biologically active compound, in addition to altering the pharmacological properties of the drug and thus can directly mediate adverse events. Furthermore, P80 has already been related to some adverse reactions of drugs that use this vehicle for their formulation [48].

In our results, the enzymatic activity of AChE was significantly inhibited by the concentration of 500 μ L of NCCS, not being affected by the other polymeric coatings. Enzymatic inhibition demonstrates the potential anticholinesterase effect of NCCS, as it prevents the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) and consequently affects the transmission of nerve impulses. AChE inhibition is reported to lead to ACh accumulation, resulting in central nervous system collapse with loss of muscle control, among other symptoms. Enzyme is present in the central nervous system which is related to motor control and cognition. In the peripheral nervous system, it acts in the modulation of nervous impulses, which includes the control of heartbeat and smooth muscle contraction [49]. However, in this case, we cannot associate the decrease in AChE activity in NCCS with the presence of locomotor deficiencies, as this polymer was safe in this regard.

Furthermore, previous studies reported the inhibition of AChE activity by chitosan. According to Hombach & Bernkop-Schnurch [50], the neuroprotective effects of chitosan and the use of nanoparticles as drug carriers across the blood-brain barrier (BBB) were evaluated, highlighting their effectiveness in the treatment of neurodegenerative diseases. A growing body of research has revealed that CS may exhibit neuroprotective properties in the treatment of Alzheimer's Disease (AD) which authors associate with inhibited AChE

activity [51]. In the present study, with an exclusively toxicological objective, other studies are important to understand the role of chitosan and NCCS in the enzymatic activity of AchE.

The cationic polymers influenced the SOD activity, according to our results in which NCCS and NCEUD had reduced enzymatic activity at higher concentrations. With NCP80 no significant result was proven, but in *C. elegans* the levels of SOD-3 expression with the CF1553 strain, showed increased expression in the group of 150 μ L of NCP80 [40]. Such evidence suggests that changes in the activity of enzymes responsible for neutralizing reactive oxygen species (ROS) possibly imply an antioxidant imbalance. The toxicity of NCs can be assessed according to diameter values, physicochemical parameters, charge, functional groups and morphology. Chemically, it is described that cationic particles have greater toxicity than anionic ones, due to greater interaction with organisms, since cells mostly have an anionic characteristic [52].

Although NCPEG seems to have modulated a smaller proportion of alterations, compared to the other coatings, the enzymatic activity of GST at 500 μ L was significantly increased in chronic exposure. This detoxification enzyme is known to act in phase II of xenobiotic metabolism [53-54]. GSTs catalyze the conjugation of reduced glutathione (GSH) and some electrophilic substrate, such as 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) [55]. Some GSTs even have GSH-dependent peroxidase exerting activities against lipid hydroperoxides and hydrogen peroxides, with broad substrate specificity against the xenobiotic substances to which the organism is exposed [56]. The toxicological scenario is a reality of several substances, in which researchers have addressed the toxic potential of nanoencapsulated products either by measuring TBARS levels and GST enzymatic activity. GST activity, when increased, can be harmful and involved with toxicity, as observed in research by Siddique *et al.* [57] comparing ZnO NPs Cu and CuSO₄. We

describe here these parameters to unravel the effects of polymers widely used in the formulation of pharmacological products.

PEG has chemical characteristics that give this polymer high pharmacological efficacy, such as chemical neutrality, hydrophilicity, high and moderate solubility in solvents, which may explain the effects described above on CAT and GST in flies chronically exposed to NCPEG in volumes of 500 μ L [58]. Wang *et al.* [59] reported that cellular uptake of PEGs was dependent on molecular weight, being absorbed only by passive diffusion while longer derivatives by endocytosis.

Finally, we found no evidence of impaired cell viability in any of the volumes of the four types of NCs used, presenting nanosafety in this regard. In this study with very high concentrations, we sought to find the toxicological profile through these various parameters of the *Drosophila* antioxidant system during a chronic exposure protocol.

5. Conclusion

This research showed the toxic potential to the antioxidant system after chronic exposure to drug-free NCs with polymeric coatings (NCP80, NCPEG, NCCS, NCEUD) in *D. melanogaster*. High concentrations were used, which affected survival, locomotor activity and parameters related to oxidative stress. Among the polymers used in polymeric coatings, NCEUD significantly impacted several study parameters, followed by high volumes of NCCS in chronic exposure.

However, the insertion of smaller volumes of all polymers was safe and did not represent harmful effects *in vivo*. We emphasize that experimental evidence suggests the involvement of oxidative stress as one of the toxicity mechanisms of these polymers. In short, further research is essential to investigate the possible biochemical pathways involved in the toxicity of polymeric coatings used in nanotechnology.

Acknowledgment

This study was proved by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); process 88881.506652/2020-01 from Edital no. 11/2020 – Seleção Emergencial “Fármacos e Imunologia” and Programa Pesquisador Gaúcho (PqG); process 19/2551-0001975-0 from Edital no. 05/2019.

References

- [1] Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2019 Dec 27;25(1):112.
- [2] Gregoriadis G, Ryman BE. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J*. 1971 Oct;124(5):58P.
- [3] Sosnik A, Carcaboso AM, Chiappetta DA. Polymeric nanocarriers: new endeavours for the optimization of the technological aspects of drugs. *Recent Pat Biomed Eng* 2008, 1:43 – 59.
- [4] Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm* 2011, 8:2101 – 2141.
- [5] Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 161 – 171.
- [6] Wicki A., Witzigmann D., Balasubramanian V., Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control Release*. 2015; 200:138 – 157.
- [8] J. Blacklock, T.K. Sievers, H. Handa, Y.Z. You, D. Oupický, G. Mao, H. Möhwald, Cross-linked bioreducible layer-by-layer films for increased cell adhesion and transgene expression, *J. Phys. Chem. B*. 114 (2010) 5283-5291.
- [9] Singh A.V., Laux P., Luch A., Sudrik C., Wiehr S., Wild A.-M., Santomauro G., Bill J., Sitti M. Review of emerging concepts in nanotoxicology: Opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicol. Mech. Methods*. 2019; 29:378 – 387.
- [10] Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Berestovoy M., Karaulov A., Nabiev I. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res. Lett*. 2018;13:44.
- [11] Doktorovova S., Souto E.B., Silva A.M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2014;87:1 – 18.
- [12] Schwartzberg LS, Navari RM. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Adv Ther*. 2018 Jun;35(6):754-767.
- [13] Khan TA, Mahler HC, Kishore RS. Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: a review. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;97(Pt A):60 – 67.
- [14] Pham Le Khanh H, Nemes D, Rusznyák Á, Ujhelyi Z, Fehér P, Fenyvesi F, Váradi J, Vecsernyés M, Bácskay I. Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives. *Polymers (Basel)*. 2022 Jan 11;14(2):279.

- [15] Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Biodegradable LongCirculating Polymeric Nanospheres. *Science* 1994, 263, 1600 – 1603
- [16] van Ballegooie C, Wretham N, Ren T, Popescu IM, Yapp DT, Bally MB. PEG Conjugated Zein Nanoparticles for In Vivo Use. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 31;14(9):1831.
- [17] U. Adhikari, N.P. Rijal, S. Khanal, D. Pai, J. Sankar, N. Bhattarai, Magnesium incorporated chitosan based scaffolds for tissue engineering applications, *Bioact. Mater.* 1 (2016) 132-139.
- [1] J.A. Delezuk, D.E. Ramirez-Herrera, B. Esteban-Fernandez de Avila, J. Wang, Chitosan-based water-propelled micromotors with strong antibacterial activity, *Nanoscale*. 9 (2017) 2195-2200.
- [19] Pilaquinga F, Cárdenas S, Vela D, *et al.* Fertility and Iron Bioaccumulation in *Drosophila melanogaster* Fed with Magnetite Nanoparticles Using a Validated Method. *Molecules*. 2021;26(9):2808.
- [20] Jain SK, Jain AK, Rajpoot K. Expedition of Eudragit® Polymers in the Development of Novel Drug Delivery Systems. *Curr Drug Deliv*. 2020;17(6):448-469.
- [21] Kriplani P, Guarve K. Eudragit, a Nifty Polymer for Anticancer Preparations: A Patent Review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2022;17(1):92-101.
- [22] R. Alasino, S. Ausar, I. Bianco, L.F. Castagna, M. Contigiani, D.M. Beltramo, Amphipathic and membrane-destabilizing properties of the cationic acrylate polymer eudragit E100, *Macromol Biosci*. 5 (2008) 207 – 21
- [23] Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335 – 44.
- [24] Schins RP, Knaapen AM. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol*. 2007;19 Suppl 1:189-98.
- [25] Spyrogianni A., Herrmann I.K., Lucas M.S., Leroux J.-C., Sotiriou G.A. Quantitative analysis of the deposited nanoparticle dose on cell cultures by optical absorption spectroscopy. *Nanomedicine*. 2016;11:2483 – 2496
- [26] Vieira SM, Michels LR, Roversi K, *et al.* A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study of formulation development and biological assessment. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;145:748-756.
- [27] de Oliveira Pacheco C, de Gomes MG, da Silva Neto MR, *et al.* Surface-functionalized curcumin-loaded polymeric nanocapsules could block apomorphine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacol Rep*. 2022;74(1):135-147.
- [28] Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp*. 2013 Jan 7;(71):50068.

- [29] Hirth F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* (2010) 9:504 – 23.
- [30] Jimenez Del-Rio, M., Martinez, C., Pardo, C.V., The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat, *Neurochem. Res.* 35 (2010) 227 – 238.
- [31] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-358.
- [32] Pérez-Severiano F, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Ríos C, Segovia J. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem Res.* 2004;29(4):729-733.
- [33] Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
- [34] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25;247(10):3170-5.
- [35] Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 1978 Oct 1;90(1):81-9.
- [36] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
- [37] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-7139.
- [38] Brien, John, *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-26, 2000.
- [39] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
- [40] Agarrayua DA, Funguetto-Ribeiro AC, Trevisan P, Haas SE, Ávila DS. Safety assessment of different unloaded polymeric nanocapsules in *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2023;263:109477.
- [41] Cé R, Silva RC, Trentin DS, *et al.* *Galleria mellonella* Larvae as an In Vivo Model to Evaluate the Toxicity of Polymeric Nanocapsules. *J Nanosci Nanotechnol.* 2020;20(3):1486-1494.
- [42] Pereira P.A., Tomas J.F., Queiroz J.A., Figueiras A.R., Sousa F. Recombinant pre-miR-29b for Alzheimer' s disease therapeutics. *Sci. Rep.* 2016; 6:19946.

- [43] Anderberg EK, Nystrom C, Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 1992;81(9):879 – 887.
- [44] Mario Diaz AC. Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Frontiers in Physiology.* 2016;7
- [45] Reilly CA, Aust SD. Measurement of lipid peroxidation. *Curr Protoc Toxicol.* 2001 Chapter 2, Unit 2 4.
- [46] Weiszhar Z, Czucz J, Revesz C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45(4):492 – 498.
- [47] Tatsuishi T, Oyama Y, Iwase K, *et al.* Polysorbate 80 increases the susceptibility to oxidative stress in rat thymocytes. *Toxicology.* 2005;207(1):7 – 14.
- [48] van Zuylen L, Verweij J, Sparreboom A. Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest New Drugs.* 2001;19(2):125 – 141.
- [49] Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Drogas que Inibem a Cholinesterase. 4^a edição, Guanabara Koogan, 2001,110-115
- [50] Hombach J., Bernkop-Schnurch A. Chitosan solutions and particles: Evaluation of their permeation enhancing potential on MDCK cells used as blood brain barrier model. *Int. J. Pharm.* 2009; 376:104 – 109.
- [51] Ouyang QQ, Zhao S, Li SD, Song C. Application of Chitosan, Chitooligosaccharide, and Their Derivatives in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mar Drugs.* 2017;15(11):322.
- [52] C. Ronzani, C. van Belle, P. Didier, C. Spiegelhalter, P. Pierrat, L. Lebeau, F. Pons, Lysosome mediates toxicological effects of polyethyleneimine-based cationic carbon dots, *J. Nanopart. Res.* 21 (2019).
- [53] Hayes, J. D., and Pulford, D. J. (1995). The glutathione S - transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445 – 600.
- [54] Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2 – 18.
- [55] Habig, W. H., and Jakoby, W. B. (1981). Assays for differentiation of glutathione S - transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398 – 405.
- [56] Mannervik, B., and Danielson, U. H. (1988). Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283 – 337

- [57] Siddique YH, Haidari M, Khan W, *et al.* Toxic potential of copper-doped ZnO nanoparticles in *Drosophila melanogaster* (Oregon R). *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(6):425-432.
- [58] Roberts, M.J.; Bentley, M.D.; Harris, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012, 64, 116 – 127.
- [59] Wang, T.; Guo, Y.; He, Y.; Ren, T.; Yin, L.; Fawcett, J.P.; Gu, J.; Sun, H. Impact of molecular weight on the mechanism of cellular uptake of polyethylene glycols (PEGs) with particular reference to P-glycoprotein. *Acta Pharm. Sin. B* 2020, 10, 2002 – 2009.

5.2 Artigo científico 1



Free Radical Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iffra20>

Relationship between toxicity and oxidative stress of the nanoencapsulated colchicine in a model of *Drosophila melanogaster*

Franciële Romero Machado, Stifani Machado Araujo, Ana Cláudia Ribeiro Funguetto, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Eliana Jardim Fernandes, Munir Mustafa Dahleh Mustafa, Sandra Elisa Haas, Gustavo Petri Guerra, Marina Prigol & Silvana Peterini Boeira

To cite this article: Franciële Romero Machado, Stifani Machado Araujo, Ana Cláudia Ribeiro Funguetto, Vandrezza Cardoso Bortolotto, Eliana Jardim Fernandes, Munir Mustafa Dahleh Mustafa, Sandra Elisa Haas, Gustavo Petri Guerra, Marina Prigol & Silvana Peterini Boeira (2023): Relationship between toxicity and oxidative stress of the nanoencapsulated colchicine in a model of *Drosophila melanogaster*, Free Radical Research, DOI: [10.1080/10715762.2022.2146500](https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2146500)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2146500>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 15 Jan 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iffra20>

Relationship between toxicity and oxidative stress of the nanoencapsulated colchicine in a model of *Drosophila melanogaster*

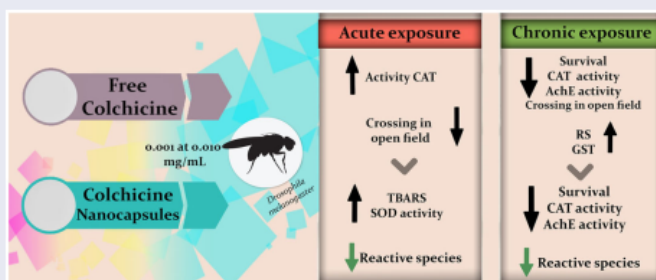
Franciéle Romero Machado^a , Stéfani Machado Araujo^a , Ana Cláudia Ribeiro Funguetto^b , Vandrezza Cardoso Bortolotto^a , Eliana Jardim Fernandes^a , Munir Mustafa Dahleh Mustafa^a , Sandra Elisa Haas^b , Gustavo Petri Guerra^a , Marina Prigol^a  and Silvana Peterini Boeira^a 

^aLaboratory of Pharmacological and Toxicological Evaluations Applied to Bioactives Molecules - LaftamBio, Federal University of Pampa, Itaqui, Brazil; ^bPharmacology Laboratory – LABFAR, Federal University of Pampa, Uruguiana, Brazil

ABSTRACT

Drug repurposing allows searching for new biological targets, especially against emerging diseases such as Covid-19. Drug colchicine (COL) presents recognized anti-inflammatory action, while the nanotechnology purpose therapies with low doses, efficacy, and decrease the drug's side-effects. This study aims to evaluate the effects of COL and colchicine nanocapsules (NCCOL) on survival, LC50, activity locomotor, and oxidative stress parameters, elucidating the toxicity profile in acute and chronic exposure in *Drosophila melanogaster*. Three-day-old flies were investigated into groups: Control, 0.001, 0.0025, 0.005, and 0.010 mg/mL of COL or NCCOL. The survival rate, open field test, LC50, oxidative stress markers (reactive species (RS) production, thiobarbituric acid reactive substances), antioxidant enzyme activity (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase), protein thiols, nonprotein thiols, acetylcholinesterase activity, and cell viability were measured. As a result, acute exposure to the COL decreases the number of crosses in the open field and increases CAT activity. NCCOL reduced RS levels, increased lipoperoxidation and SOD activity. Chronic exposure to the COL and NCCOL in high concentrations implied high mortality and enzymatic inhibition of the CAT and AChE, and only the COL caused locomotor damage in the open field test. Thus, NCCOL again reduced the formation of RS while COL increased. In this comparative study, NCCOL was less toxic to the antioxidant system than COL and showed notable involvement of oxidative stress as one of their toxicity mechanisms. Future studies are needed to elucidate all aspects of nanosafety related to the NCCOL.

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- Drug repositioning contributes to research involving emerging diseases.
- Nanoencapsulation of drugs aims to increase bioavailability.
- Certain concentrations of nanocolchicine affect *Drosophila* antioxidant enzymes.
- Oxidative stress pathways are involved in colchicine drug toxicity.
- The nanosafety of nanomaterials is essential for further research on a larger scale.

CONTACT Silvana Peterini Boeira  silvanaboeira@unipampa.edu.br  Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Rua Luiz Joaquim de Sá Brito – Promorar, Itaqui, RS 97650-000, Brazil

 Supplemental data for this article is available online at <https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2146500>

© 2023 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Introduction

Research aimed at the repurposing of drugs is growing in the scientific community, becoming more evident with the advent of the Covid-19 pandemic and the urgency of pharmacological treatments in a short period. Drug repurposing stands out as a search for a new therapeutic purpose for existing drugs in the pharmaceutical market, including benefits: introduction rate of about 150%, compared to new drugs, reduction of time, and high financial costs of stages of development, which are essential aspects in emerging pathologies [1,2].

Growing demand for pharmacological alternatives has emerged with Covid-19, which is an infectious disease caused by the virus SARS-CoV-2 and became a Public Health Emergency by the World Health Organization (WHO) due to the high rate of spread [3]. In the context of this disease, the immune system seeks to prevent the progression of the disease, which involves the phase of the severe inflammatory response [4,5]. Several pharmacological candidates were proposed in researches, either for their antiviral mechanisms such as remdesivir, chloroquine, hydroxychloroquine, lopinavir, and ritonavir or for their anti-inflammatory action such as tocilizumab, interferon alfa-2b, baricitinib, among other drugs targeted in clinical studies [6].

Among the promising drugs in repurposing, colchicine (COL) is a tricyclic alkaloid extracted from the plant *Colchicum autumnale* widely used in therapies such as gout and acute familial Mediterranean fever [7,8]. The mechanism is the inhibition of tubulin polymerization and microtubule generation, effects on cell adhesion molecules, inflammatory chemokines, and inflammasome [9,10].

The function of COL against Covid-19 was reported in a clinical trial, in which patients had a better evolution of their clinical condition and reduced the need for supplemental oxygen [11]. Regardless of the mechanism, COL acts positively, either through the inflammasome or in the lower migration and activation of neutrophils [5,12]. To expand the potential of COL in drug repurposing, the nanoencapsulation process aims to increase the bioavailability of the encapsulated substance, minimize the occurrence of side-effects, extend the shelf-life, and control the delivery of active components [13]. Furthermore, nanomedicine involves the nanoencapsulation of small molecules/drugs in nanocarriers to reduce systemic toxicity and allow the compound to act at its target site [14].

However, toxicological assessment is crucial in research with the synthesis of nanocapsules. For this, animal models such as rats, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, zebrafish, and hydra help to unravel the toxic aspects of nanoencapsulation drugs

[15]. *Drosophila* is relevant in the study of nanotoxicity because it has a short life-cycle, easy handling, different stages of development, physiological similarity, and homology with humans. The fruit fly model does not involve ethical issues and experimental protocols of several concentrations can be tested [15,16].

In response to xenobiotic compounds, the formation of reactive oxygen species (ROS) may occur. ROS are formed during cellular metabolism and participate in the redox balance, presenting benefits in biological processes, but their high production is deleterious to the organism [17]. In the study of toxicity, understanding of highly conserved pathways that control aspects of development, xenobiotic metabolism, and the stress response to toxic substances are widely accepted [18].

In general, we expect that the nanoencapsulation of the COL causes fewer changes in the antioxidant and locomotor system of *Drosophila* compared to COL. In the present study, we aim to understand whether oxidative stress is related to the toxicity profile of nanoencapsulated COL. From the present study, further research is necessary, especially with the pharmacological repurposing of colchicine nanocapsules (NCCOL).

Material and methods

Reagents

Reagents purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): COL (C3915), 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), thiobarbituric acid (TBA), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide (Resazurin), quercetin e N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine. All other reagents were acquired from the Laboratory Laftambio Pampa, Campus UNIPAMPA, Itaqui.

Synthesis of NCCOL

NCCOL was synthesized and obtained through the partnership with the Pharmacology Laboratory of the Federal University of the Pampa (Campus Uruguiana). The synthesis of nanocapsules occurred using the pre-formed polymer nanoprecipitation method, according to the methodology described by Venturini et al. [19], with some modifications. For the preparation of the NCCOL containing polysorbate 80 (P80), the organic phase was composed of PCL, Lipoid S45, medium chain triglyceride (TCM), acetone, and COL kept under magnetic stirring at 60 °C until total solubilization of the components occurs. COL was added to the organic

phase resulting in a final concentration of 1 mg/mL. Soon after, the organic phase was injected into the aqueous phase composed of polysorbate 80 and water and kept under magnetic stirring at room temperature for 10 min to form the nanocapsules. The nanoparticles (NPs) were submitted to a rotary evaporator (BUCHI) for total evaporation of acetone and partial evaporation of the water resulting in a final volume of 10 mL [19].

***Drosophila melanogaster* culture**

Drosophila melanogaster (Harwich strain) was from Laftambio Pampa (Federal University of Pampa, Itaqui, Brazil). The flies were kept under controlled conditions of temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), relative humidity (60–70%) in a 12-h light/dark cycle and a standard diet included (76.59% corn flour, 8.51% wheat germ, 7.53% sugar, 7.23% powdered milk, 0.43% of salt, and 0.08% of nipagin).

Experimental protocol

Wild-type *Drosophila melanogaster* flies of both sexes (1–3 days old) were exposed to concentrations of 0.001 mg/mL, 0.0025 mg/mL, 0.005 mg/mL, and 0.010 mg/mL of COL or NCCOL. The experimental protocol was divided into acute (48 h) and chronic (10 days) exposure (Figure 1).

COL was diluted in distilled water and NCCOL (liquid) was added directly to the 5 mL food medium. For the control group, polymeric nanocapsules unloaded with

polysorbate 80 coating (NCs-P80) (matrix used in the nanoencapsulation of COL) were added. The food medium was chosen following toxicological studies with NPs, with flies periodically transferred to a new diet [20].

The survival of the experimental groups was counted daily until the end of the experiment. Finally, behavioral tests and biochemical analysis were performed.

Survival rate and LC50

The survival rate was obtained by evaluating the number of live flies counted daily in acute treatment for 48 h and chronic treatment for 10 days. Each group contained 50 flies and six independent experiments were performed ($n=6$) with a total of 300 flies (per group) for each exposure. The mean of the lethal concentration (LC50) for chronic exposure was found based on mortality after 10 days of exposure [21].

Behavioral test

Open field test

Assessment of locomotor performance according to Hirth [22]. For this, the number of quadrants traversed by each fly during 60 s was measured using Petri dishes marked with squares measuring 1 cm (six independent experiments were performed with five flies per group, totaling 30 flies per experimental group).

Tissue preparation

A total of 12 flies were homogenized in 600 μL of 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, and centrifuged at 95g for 10 min (4°C), except for reactive species and resazurin which followed a centrifugation protocol of 1213 g for 5 min. For the tissue preparation for nonprotein thiols (NPSH) and protein thiols (PSH) quantification, 10 flies were homogenized in 500 μL (20 mM HEPES buffer, pH 7.0) and centrifuged at 9520g for 5 min. After centrifugation, the supernatant obtained was separated for use in biochemical assays.

Biochemical analysis

Quantification of reactive species

The quantification of the 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorescence to determine the level of reactive species (RS) follows according to the methodology described by Pérez-Severiano et al. [23]. After sample preparation and incubation for 1 h, RS levels were obtained with the Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer (Agilent Technologies) in excitation of

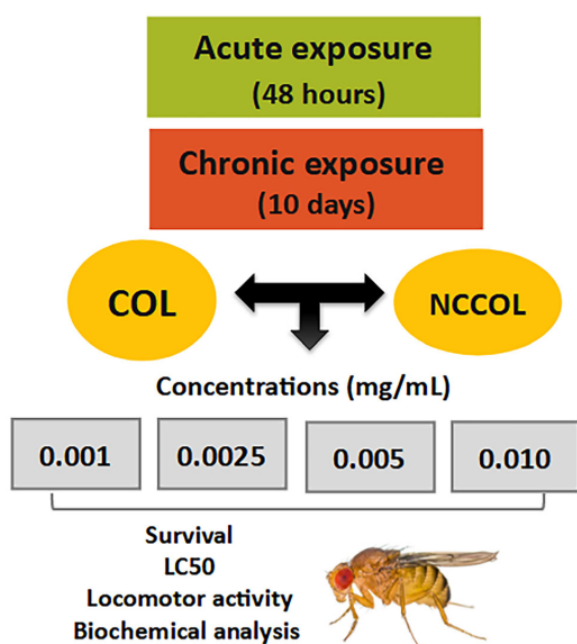


Figure 1. Experimental schedule.

488 nm and emission of 530 nm. Values were measured by calculating the percentage of the control (% of the control of 6 independent experiments/42 flies for each group).

Quantification of lipid peroxidation

Lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [24] was measured. Reagents were used: TBA (0.8%; pH 3.2), acetic acid/hydrochloric acid (HCl) (20%, pH 3.5), and sodium dodecyl sulfate (SDS 8.1%). Samples were then incubated (2 h at 95 °C) and were quantified absorbance values at 532 nm in a microplate reader. Values were normalized using protein concentration to obtain levels in nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein). Results are expressed as a percentage in relation to the control group (% of the control of 6 independent experiments/60 flies for each group).

Acetylcholinesterase activity

To quantify the activity of the enzyme, potassium phosphate buffer (KPi 0.25 M, pH 8.0) and DTNB 5 mM were utilized. The enzymatic reaction begins when the sample supernatant and the acetylthiocholine (ASCh) 7.25 mM is added. This enzymatic reaction was measured for 2 min at 412 nm with values expressed in $\mu\text{mol ASCh/h/mg}$ of protein according to the method proposed previously [25] obtained from 6 independent experiments/72 flies for each group.

Catalase enzyme activity

The method to assess catalase (CAT) activity was performed as proposed by Aebi [26] with few modifications. Briefly, samples were added to 0.25 M potassium phosphate buffer (KPi/EDTA (2.5 mM, pH 7.0) solution, 30% of hydrogen peroxide (H_2O_2), and Triton X-100. Samples were read at 240 nm for 1 min (6 independent experiments/72 flies for each group).

Determination of superoxide dismutase activity

The detection of the superoxide dismutase (SOD) activity was using a protocol based on the inhibition of epinephrine autoxidation according to Misra and Fridovich [27] and Sun and Zigman [28]. For the assay were added the following reagents to the sample: sodium carbonate buffer (57.7 mM), kept at a temperature of 30 °C, and Epinephrine solution (6 mM) added to start the enzymatic reaction. SOD activity was measured spectrophotometrically by evaluating adrenochrome formation at 480 nm in 120 s. These data were expressed as UI/protein (6 independent experiments/72 flies for each group).

Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase (GST) activity was conducted according to the methodology proposed by Habig et al. [29]. To perform the analysis, potassium phosphate buffer 0.25 M/EDTA (2.5 mM, pH 7.0), distilled water, and glutathione (GSH) 100 mM were used. After adding the supernatant of the sample, the substrate CDNB (50 mM CDNB) begins the reaction at 340 nm for 2 min. Enzyme activity was expressed as nmol CDNB conjugated min⁻¹ mg protein⁻¹ from 6 independent experiments/72 flies for each group.

Protein and nonprotein thiols

PSH and NPSH content were analyzed with minor modifications. For NPSH, the supernatant was used with the addition of DTNB 5 mM and kept for 15 min for reading at 412 nm. For PSH, only the pellet was resuspended in HEPES 20 mM (pH 7.0), and DTNB 5 mM added. After 15 min, the reading was carried out at 412 nm [30]. Results are expressed as the percentage of the control group (6 independent experiments/10 flies per group, totaling 60 flies per experimental group).

Cell viability assessment

The cell viability method evaluates the reduction of Resazurin for the formation of the fluorescent pink resorufin, with color intensity proportional to the number of living cells [31]. The supernatant was incubated for 1 h in a 96-well microplate containing the buffer and resazurin (0.2 mg/mL), without the presence of substrates for cell or mitochondrial fragmentation. The reading was obtained through the microplate reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) at 573 nm and the data were expressed as a percentage compared to control group.

Protein determination of samples

To measure the protein concentrations, the procedure Bradford with Coomassie Brilliant Blue G-250 and bovine serum albumin as standard was used [32].

Statistical analysis

The survival rate was measured using Mantel–Cox log-rank test curves and the significance between the groups was obtained by one-way analysis of variance (ANOVA) (values of mortality used in the survival curve). LC50 from mortality (chronic exposure) through nonlinear regression analysis (confidence interval of 95%). Other analyses were conducted on the normality test (Shapiro–Wilk test) to choose the appropriate statistical

test. ANOVA, followed by Tukey's test but for nonparametric data (Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test) was performed. Statistical values were expressed as mean $\pm$ SEM and values less than $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Survival rate is only affected by chronic exposure

In acute exposure, the Log-rank test (Mantel–Cox) did not demonstrate a difference between the survival curves for COL ($p = 0.4449$) and NCCOL ($p = 0.1356$), respectively in Figure 2(A) and (B). In chronic exposure, the difference between the survival curves for COL ($p < 0.0001$) and NCCOL ($p < 0.0001$) with a significant reduction in the survival rate according to the concentration (Figure 2(C) and (D)).

Due to the difference in the curves in the chronic exposure, we included the significance between the groups by ANOVA by the number of dead flies (supplementary material). In fact, chronic exposure to COL ($F_{(4, 25)} = 60.32$) at 0.0025 to 0.010 mg/mL statistically increased mortality compared to control. A similar result in chronic exposure to NCCOL ($F_{(4, 25)} = 107.8$; $p < 0.0001$) was observed, with mortality increasing according to

concentration. However, the 0.0025 mg/mL group had a lower p value ($***p \leq 0.001$) compared to exposure to COL ($****p \leq 0.0001$), demonstrating a high number of dead flies and elevated toxicity in the free form of COL.

LC50 for chronic exposure of COL and NCCOL

The values obtained for LC50 for COL = 0.00243 mg/mL (Figure 3(A)) and NCCOL 0.00361 mg/mL (Figure 3(B)) in chronic exposure of 10 days. When comparing the values, COL requires more attention in its administration, as it has a lower concentration range compared to NCCOL.

COL influenced locomotor performance of *Drosophila*

The assessment of locomotor performance is important to assess whether a given concentration of a compound compromises the locomotor and exploratory activity of the fly. For acute exposure to COL, the open field showed statistical differences (Figure 4(A)) in the 0.010 mg/mL group, that had fewer crossings compared to the control. This higher concentration reduced locomotor performance of flies acutely exposed to COL ($p = 0.0376$). The nanoencapsulated form of COL (Figure 4(B)) at none of the concentrations tested caused impairment of

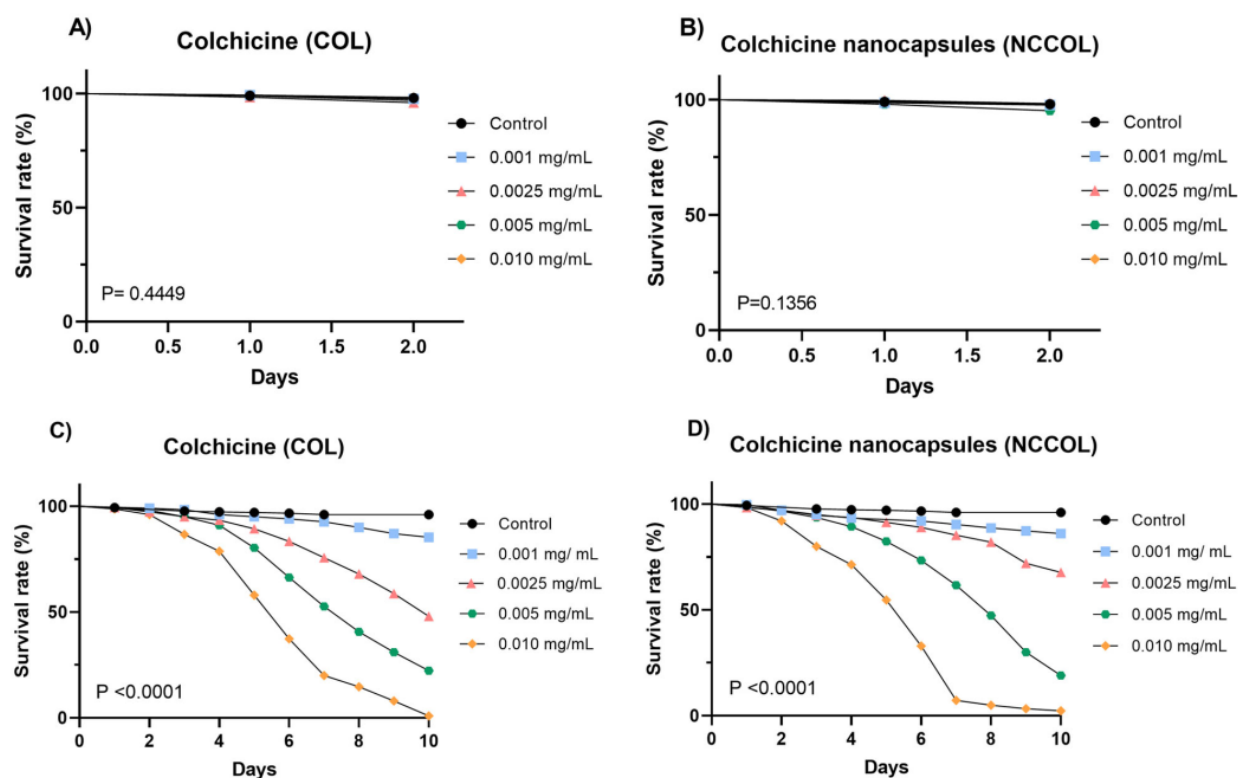


Figure 2. Assessment of the different concentrations of COL and NCCOL on the survival rate during acute (A, B) and chronic (C, D) exposure. Data were collected every 24 h during the 2 days (acute exposure) or 10 days (chronic exposure). The total number of flies (600 per group) represents the sum of six independent experiments. The percentage of survival was measured using Mantel–Cox log-rank test curves.

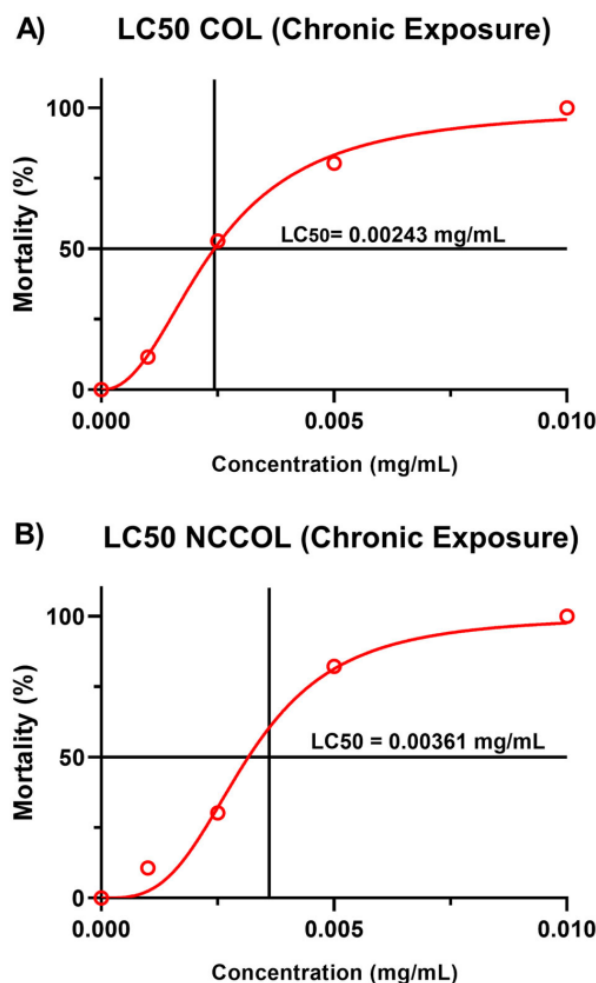


Figure 3. Lethal Concentration 50 (LC50) of colchicin (A) and nanoencapsulated form (B) in 10-day chronic exposure. LC50 values obtained from mortality data from six independent experiments ($n = 50$ flies each) following the 95% confidence interval.

exploratory activity in acute exposure ($F_{(4, 25)} = 0.6899$; $p = 0.6058$). In the 10-day exposure, only flies exposed to 0.005 mg/mL of COL had significantly fewer crossings compared to the control in the open field (Figure 4(C); $F = 3.582$; $p = 0.0320$). But for NCCOL, none of the concentrations altered the locomotor activity of flies in chronic exposure (Figure 4(D); $p = 0.8763$).

NCCOL reduced RS levels at certain concentrations

Acute exposure to COL did not evidence a significant generation of RS in *Drosophila* ($F_{(4, 25)} = 2.661$; $p = 0.0562$) compared to the control group (Figure 5(A)). On the other hand, the nanocapsules form was not an inducer of increased of RS levels, since significantly lower values are found at 0.001 mg/mL and 0.0025 mg/mL when compared to the control (Figure 5(B)) ($F_{(4, 25)} = 14.16$; $p < 0.0001$).

It is clear from the graph that chronic exposure to the free form of COL caused a significant increase in RS at a concentration of 0.005 mg/mL (Figure 5(C); $F_{(3, 20)} = 54.88$; $p < 0.0001$). This increase could be noticed at higher concentrations, which would explain the non-survival of flies chronically exposed to 0.010 mg/mL. The nanoformulation (NCCOL) at 0.0025 mg/mL concentration exerted important effects on this parameter, reducing RS levels in relation to control, but not for the 0.005 mg/mL group (Figure 5(D); $p = 0.0063$). Demonstrates that COL possibly has pro-antioxidant characteristics and NCCOL acted inversely at a specific concentration.

Lipid peroxidation status is modified by COL and NCCOL

Exposed flies acutely exposed to COL showed no change in TBARS levels (Figure 6(A)) compared to control ($F_{(4, 25)} = 3.389$; $p = 0.0240$) and NCCOL ($p = 0.0115$) showed an increase only in the highest concentration range (0.010 mg/mL) compared to control group (Figure 6(B), $p = 0.0115$). When associating the control group and the COL (Figure 6(C)) at different concentrations, there was no increase in the percentages of TBARS in flies exposed chronically ($F_{(3, 20)} = 2.204$; $p = 0.1192$). Conversely, in the 0.005 mg/mL NCCOL group, chronic exposure caused a significant increase in TBARS levels (Figure 6(D); $F_{(3, 20)} = 7.749$; $p = 0.0013$).

NCCOL alters AChE activity only on chronic exposure

Drosophila melanogaster acutely exposed to COL (Figure 7(A)) did not demonstrate altered acetylcholinesterase (AChE) activity at any of the concentrations compared to the control ($F_{(4, 25)} = 3.043$; $p = 0.0358$). Furthermore, acute exposure to all concentrations of the NCCOL (Figure 7(B)) evaluated did not affect enzyme activity ($F_{(4, 25)} = 1.210$; $p = 0.3316$). In the chronic exposure protocol, COL ($F_{(3, 20)} = 8.811$; $p = 0.0006$) and NCCOL ($p = 0.0055$) significantly decreased AChE activity at concentrations of 0.0025 and 0.005 mg/mL (Figure 7(C,D)). In contrast to acute NCCOL exposure, chronic exposure affected this parameter.

CAT enzymatic activity is reduced by COL and NCCOL in chronic exposure

The graph showed a significant increase in CAT enzyme activity even at low COL concentrations such as 0.001 and 0.0025 mg/mL compared to the control (Figure 8(A); $F_{(4, 25)} = 4.507$; $p = 0.0070$). NCCOL (Figure 8(B); $F_{(4, 25)} = 4.507$; $p = 0.0070$).

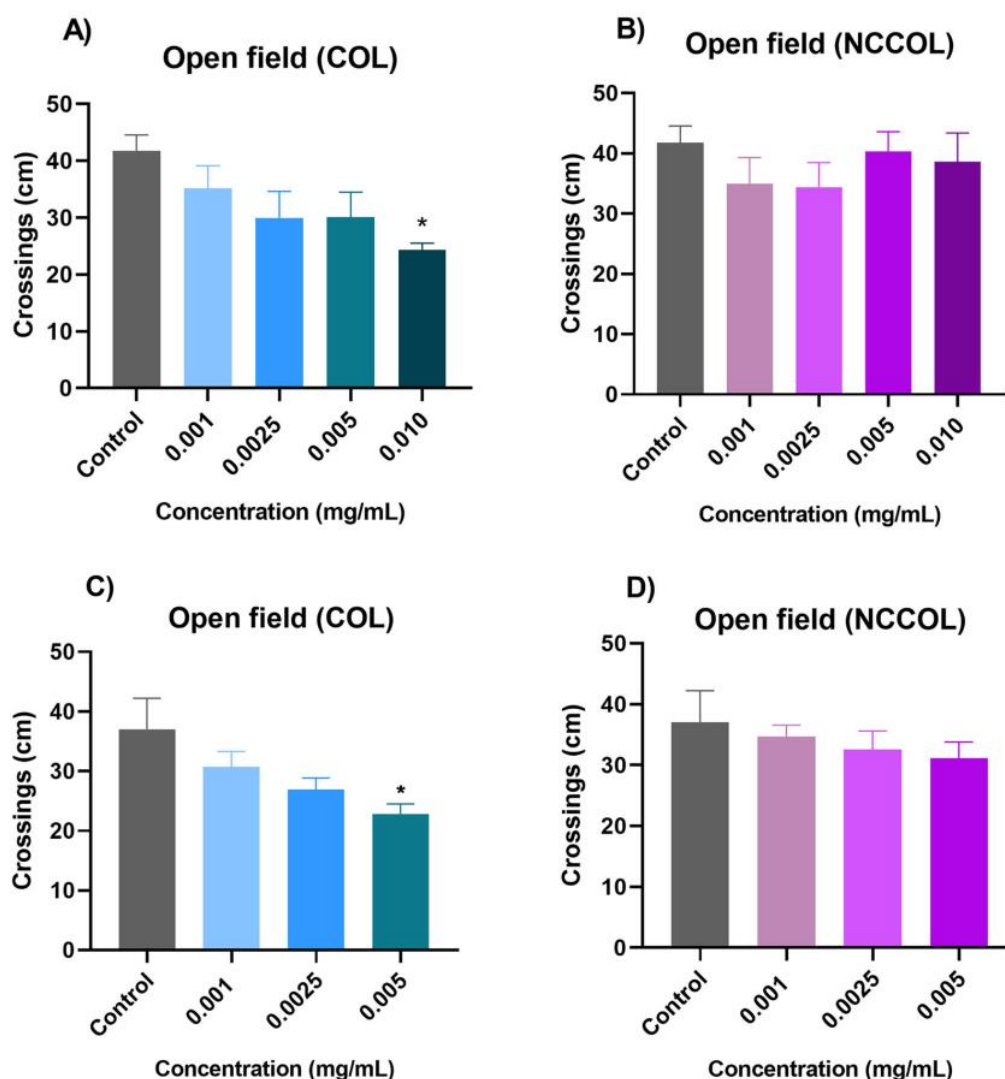


Figure 4. Assessment of acute (A, B) and chronic exposure (C, D) to free and nanoencapsulated colchicine in locomotor performance by open field test in *Drosophila melanogaster*. Values of six independent experiments = five flies per group/treatment. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons (B, C). For nonparametric data Kruskal–Wallis test (A, D). Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

$_{25}) = 2.445$; $p = 0.0728$) showed no statistical differences between the analyzed data in acute exposure. A significant statistical difference occurred in the chronic exposure to the free form of COL with a reduction of CAT activity by 0.0025 and 0.005 mg/mL in relation to the control (Figure 8(C); $F_{(3, 20)} = 5.938$; $p = 0.0046$), but in NCCOL only a concentration of 0.005 mg/mL influenced the lower activity of this important antioxidant enzyme (Figure 8(D); $F_{(3, 20)} = 3.389$; $p = 0.0382$).

SOD activity is increased by NCCOL

SOD activity was not altered by COL treatments (Figure 9(A); $F_{(4, 25)} = 2.120$; $p = 0.1082$), but the higher concentration of the nanoencapsulated form caused a

significant increase in enzyme activity in the 0.010 mg/mL compared to the control (Figure 9(B); $F_{(4, 25)} = 3.374$; $p = 0.0244$). Regarding SOD activity, it was not significantly modified in chronic exposure in any of the groups (0.001–0.005 mg/mL) of COL (Figure 9(C); $F_{(3, 20)} = 0.1717$; $p = 0.9142$) or NCCOL (Figure 9(D); $p = 0.4705$).

COL and NCCOL increased the GST activity in flies exposed chronically

Acute exposure to different concentrations of COL did not promote any change in the activity of the GST enzyme (Figure 10(A,B)). Thus, levels ranging from 0.001 to 0.010 mg/mL concentration of COL ($F_{(4, 25)} = 0.1221$; $p = 0.9732$) and NCCOL ($F_{(4, 25)} = 0.3619$;

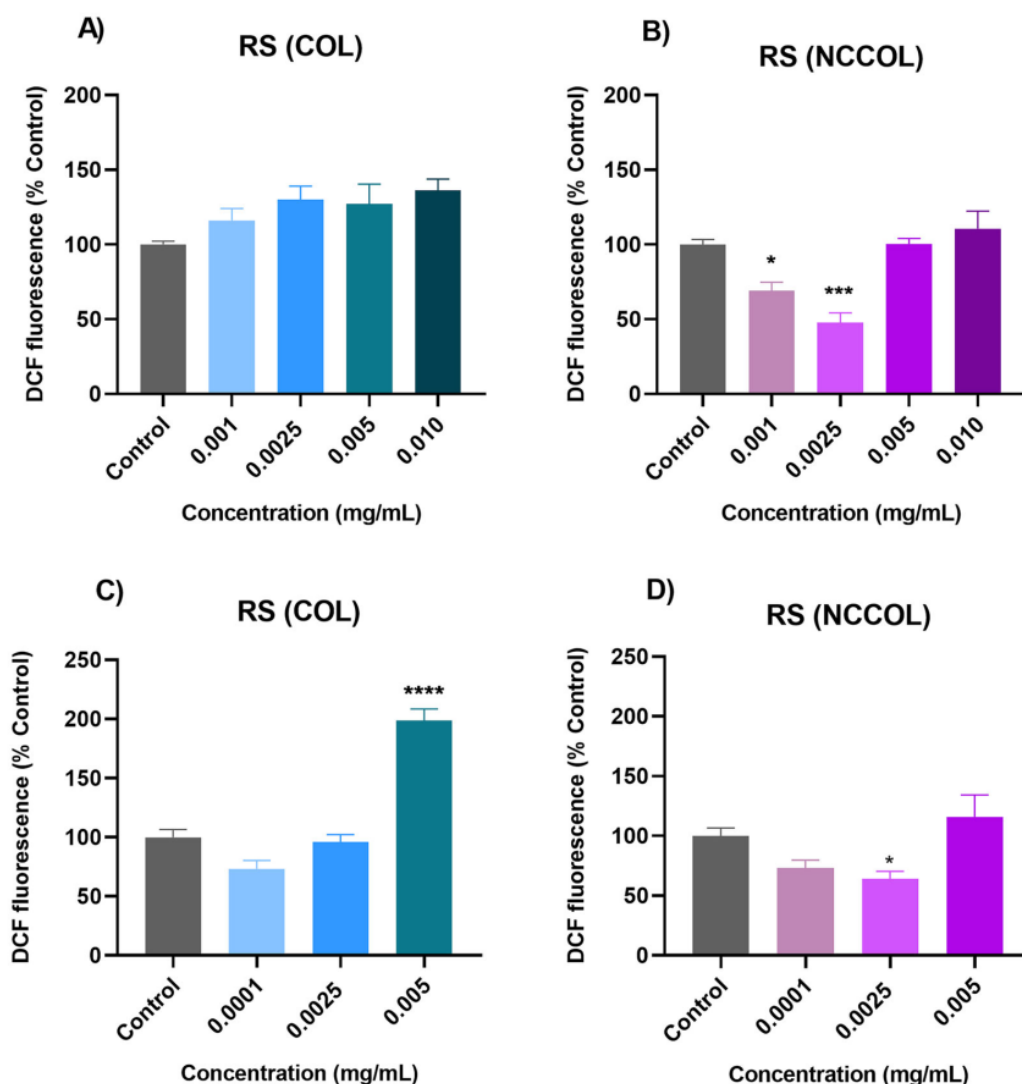


Figure 5. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to free and nanoencapsulated colchicine on the generation of reactive species (RS) in *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons (A–C). For nonparametric data the Kruskal–Wallis test (D). Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

$p=0.8333$) had no significant difference compared to the control. Chronically exposed flies differed in the 0.005 mg/mL group as the GST activity was significantly higher compared to the control group (Figure 10(C); $F_{(3, 20)} = 5.282$; $p=0.0076$). This finding is opposite to that found in NCCOL which did not differ from the control ($F_{(3, 20)} = 4.362$; $p=0.0161$).

COL and NCCOL did not affect the cell viability of flies

As for resazurin levels, necessary to characterize whether there is an alteration in cell viability and consequently to test the toxicity of a compound, no significant results were found for both the free form (Figure 11(A); $F_{(4, 25)} = 0.8987$; $p=0.4795$) and

nanoencapsulated (Figure 11(B); $F_{(4, 25)} = 0.2037$; $p=0.9340$) when compared with the control group in acute and chronic exposure (Figure 11(C); $F_{(3, 20)} = 2.760$; $p=0.0690$ and Figure 11(D); $F_{(3, 20)} = 2.148$; $p=0.1261$).

Protein and nonprotein thiol levels

Both PSH and NPSH levels did not differ statistically in acute and chronic exposure. PSH data for the two forms of COL were not different from the control in COL (Figure 12(A); $p=0.3441$) and NCCOL ($F_{(4, 25)} = 1.499$; $p=0.2325$). Also, chronic exposure (Figure 12(C,D)) did not affect PSH levels in the target groups of this treatment in COL (Figure 12(C); $F_{(3, 20)} = 1.599$; $p=0.2211$) and NCCOL ($F_{(3, 20)} = 1.704$; $p=0.1983$). A similar result

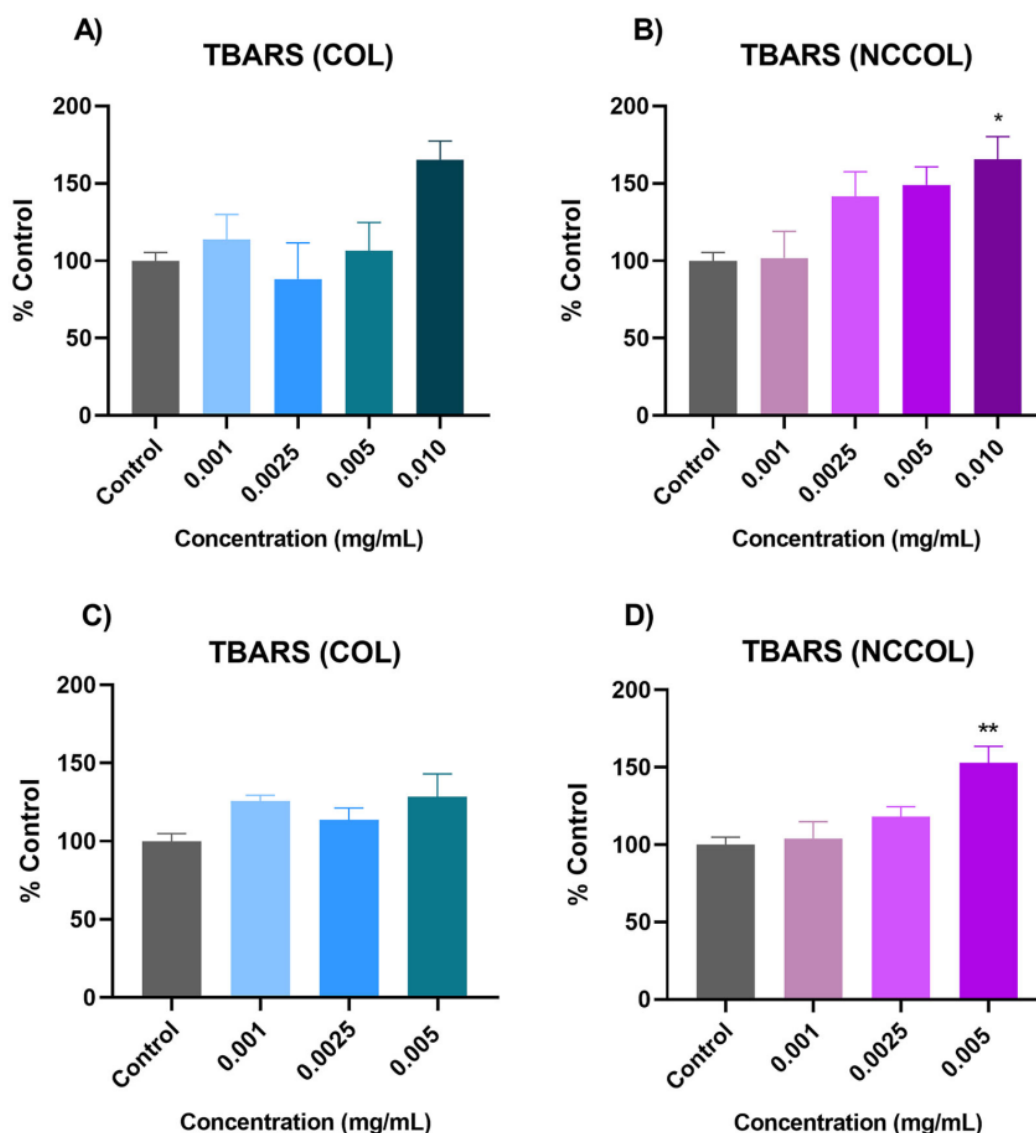


Figure 6. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to free and nanoencapsulated colchicine on the generation of thio-barbituric acid reactive substances (TBARS) in *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons (A, C, and D). For non-parametric data the Kruskal–Wallis test (B). Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

is observed in NPSH for COL ($F_{(4, 25)} = 1.147$; $p = 0.3576$) and NCCOL ($F_{(4, 25)} = 0.5687$; $p = 0.6877$) in acute exposure (Figure 13(A,B)). Also, no significant difference in chronic protocol for COL (Figure 13(C); $F_{(3, 20)} = 0.8215$; $p = 0.4973$) and NCCOL (Figure 13(D); $F_{(3, 20)} = 1.097$; $p = 0.3736$).

Discussion

The present study investigated the effects of the free and NCCOL under different concentrations and exposure periods in *Drosophila melanogaster*. As a new prod-

uct of nanotechnology, characterizing the toxicological profile of the NCCOL in living organisms is necessary to understand the influence of certain substances on biochemical mechanisms.

Different conclusions were found according to the exposure protocol employed and the target concentrations of the study. For example, acute exposure did not affect the survival rate, while chronic exposure drastically affects this parameter in COL and NCCOL. In organisms such as *Drosophila*, research reports that decreased or increased life expectancy is often associated with changes in the biology of the ROS, associat-

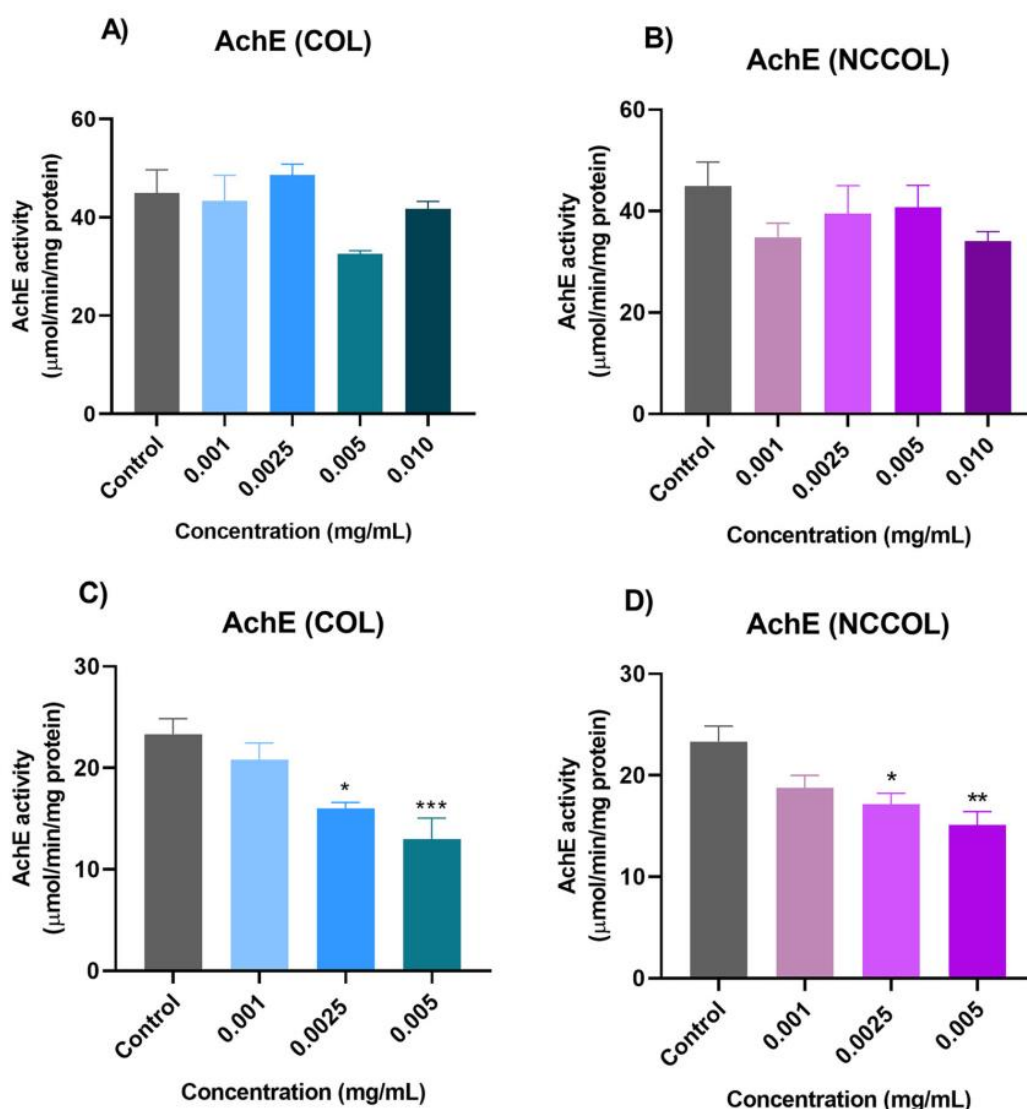


Figure 7. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to different concentrations of free and nanoencapsulated colchicine on the enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE) in *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons (A-C). For non-parametric data the Kruskal–Wallis test (D). Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

ing the assessment of oxidative stress parameters with modification in survival [33]. Previously, the effects of COL by Isaenko et al. [34] in other phases of fly development were demonstrated in wild-type larvae exposed to 1, 3, 5, 8, and 10 $\mu\text{g/mL}$ (COL). COL affected larval viability, resulting in dose-dependent death of pupae with a higher percentage at 10 $\mu\text{g/mL}$ [34]. We observed the effects of COL and NCCOL during 10-day exposure following previous studies in nanotoxicology. As, for example, in the study by Tian et al. [35], silver NPs affected the survival rate and demonstrated the importance of this assessment for a longer time.

The oxidative stress is caused by the excess production of free radicals and inefficiency of the antioxidant defense system in neutralizing these molecules with

oxidizing power [36]. Among the exogenous factors that induce oxidative stress are xenobiotic compounds that promote, *via* cytochrome P450 or the redox cycle, the production of ROS [37]. It is described that even if other factors are related to the toxicity of NPs, stress, and ROS are the root cause of this toxicity [38,39]. Some parameters involved in oxidative stress were significantly altered in flies exposed to high concentrations of COL and NCCOL. In our study, chronic exposure to a concentration of 0.005 mg/mL of COL caused an increase in RS levels, which could cause oxidative damage by COL. NCCOL, even in the 0.005 mg/mL group, did not increase to RS. Previously, *in vitro* studies reported the reduction of intracellular ROS in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Cells were

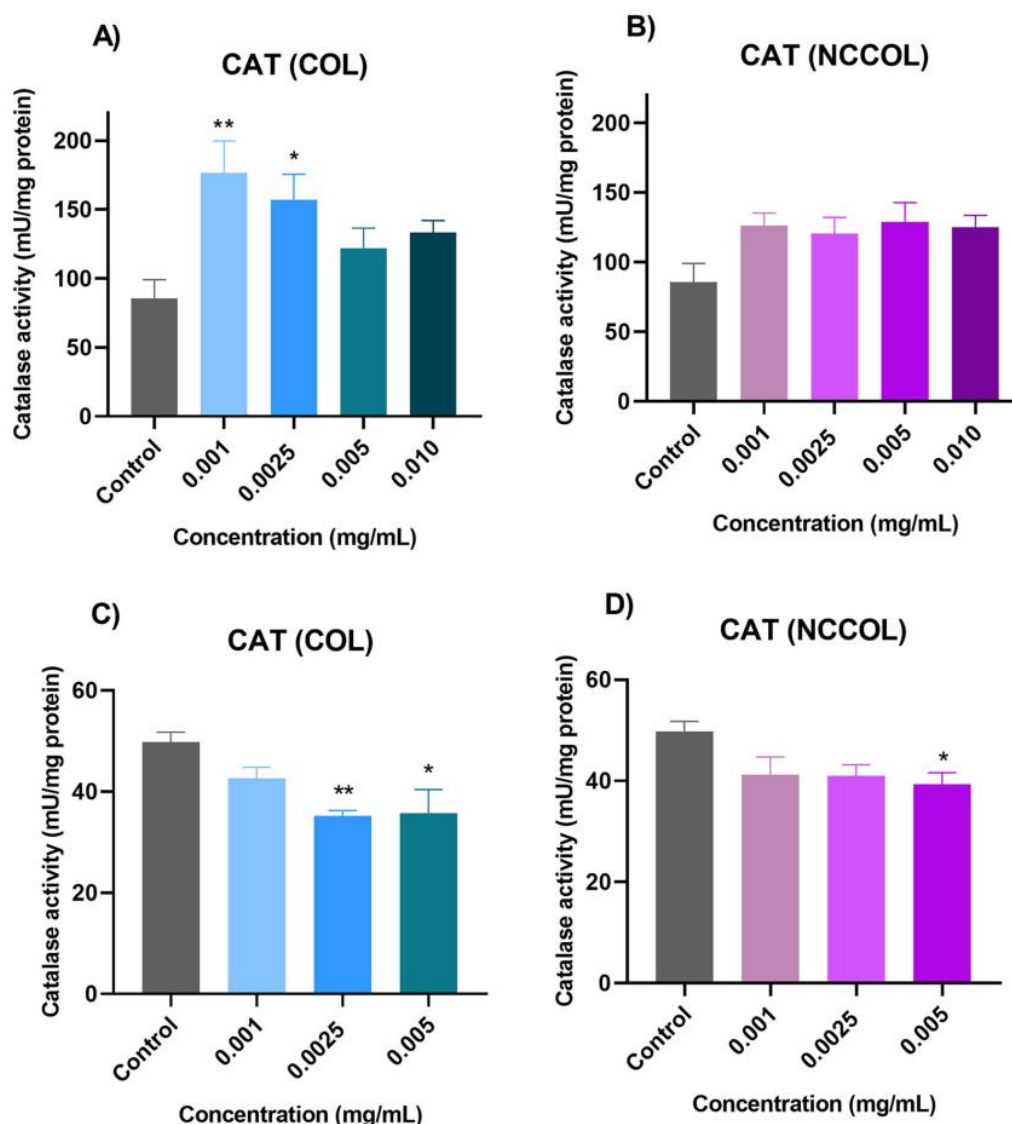


Figure 8. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to free and nanoencapsulated colchicine on the enzymatic activity of catalase (CAT) in *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

pretreated with COL (0–100 nM) for 2 h and exposed to cholesterol crystals (0.5 mg/mL) for 10–24 h [40]. The results probably differ due to the particularities between *Drosophila* and HUVECs, although in parts NCCOL corroborated the findings described by the decrease in RS.

In contrast, presence of lipid peroxidation was observed in NCCOL. TBARS levels were elevated both at acute exposure to 0.010 mg/mL and chronically at 0.005 mg/mL. TBARS is an oxidative stress marker produced at the end of the lipid oxidation steps, useful to assess cell membrane lipid peroxidation. Thus, excess free radicals result in damage, such as lipid peroxidation and the emergence of various pathologies

resulting from oxidative stress [41]. Although increased levels of RS in COL could be associated with lipid peroxidation, only exposure to NCCOL evidenced a significant increase in TBARS. Anyway, susceptibility to oxidative stress became evident at the highest concentrations tested.

Furthermore, possible neurotoxicity and anticholinesterase action of the COL and NCCOL was evident due to inhibition of the AChE activity on chronic exposure to 0.0025 and 0.005 mg/mL. This inhibition prevents the hydrolysis of acetylcholine, a neurotransmitter found in the *Drosophila* nervous system and a component of the cholinergic function involved in synaptic transmission and conduction [42,43]. In *Drosophila*,

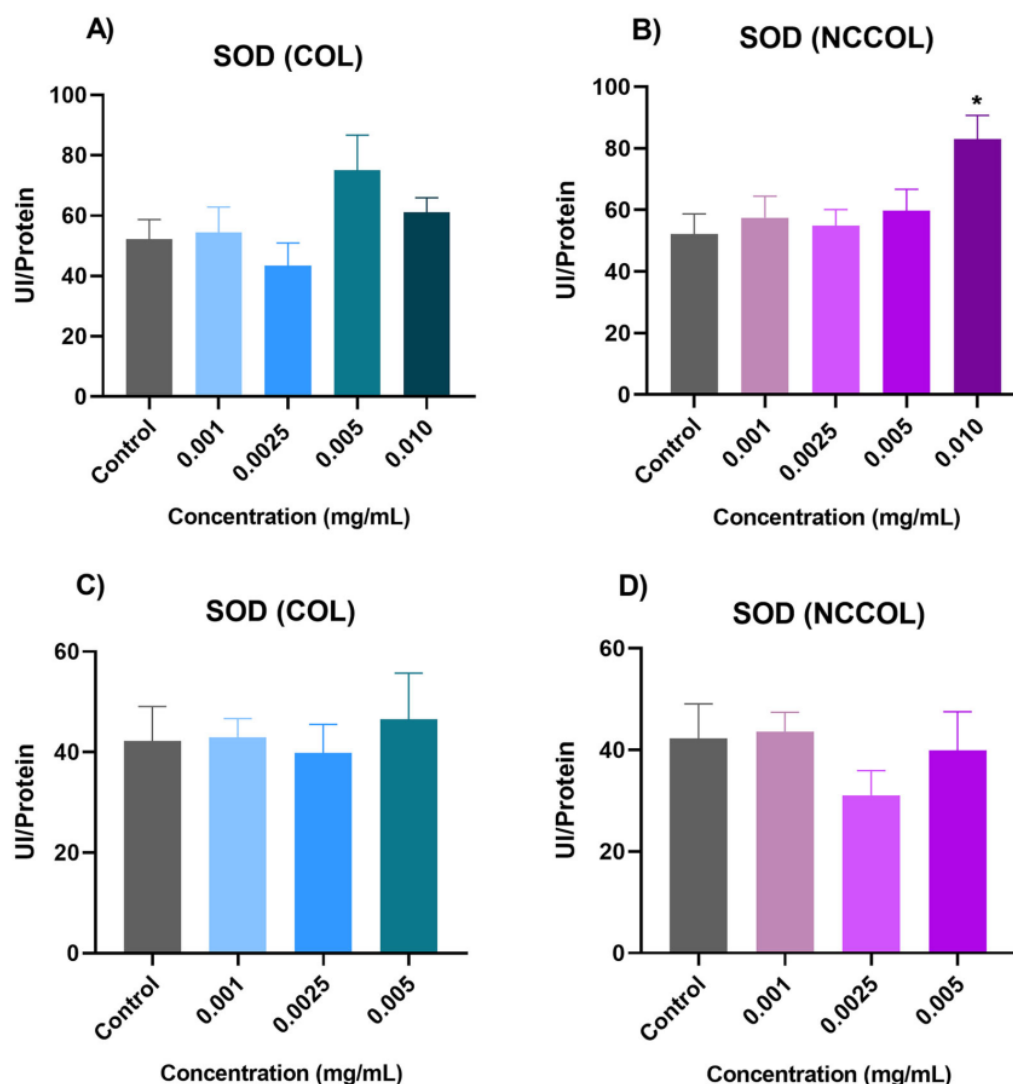


Figure 9. Effects of acute (A, B) and chronic exposure (C, D) to free and nanoencapsulated colchicine on the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) in *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

acetylcholine is an excitatory neurotransmitter, abundant and expressed in regions of the fly brain, such as the protocerebrum, mushroom bodies, and central complex [44]. As the inhibition of AChE was observed, it is reported in the literature that its inhibition leads to an increase in acetylcholine levels, causing adverse effects: increased salivation, gastrointestinal disturbance, and muscle paralysis [45]. Determined concentrations tested resulted in locomotor deficits in flies, which may be related to the change in reported AChE activity. An association of cholinesterase inhibition with changes in locomotor activity is already well described in the literature [46].

In the present study, only COL can suggest potential toxicity in the locomotor function of flies. In the open field test, the reduced number of crossings found is a

predictor of the locomotor deficits observed in acute and chronic exposure to the high concentration of COL. It seems that exposure to NCCOL prevented the locomotor system of the fly from being compromised, which is positive in this regard. For other NPs offered orally, such as zinc oxide (ZnO) NPs, the authors describe that the generation of ROS in the interaction with the cell membrane and oxidative stress were associated as the main mechanism of toxicity. Authors describe that such a mechanism causes the imbalance in the muscular coordination of *Drosophila* larvae, as reported in the larval tracking behavioral assay [20]. This same alteration in the antioxidant system possibly explains the motor deficits presented here.

We demonstrate that various enzymes involved in the antioxidant system can be affected by exposure to

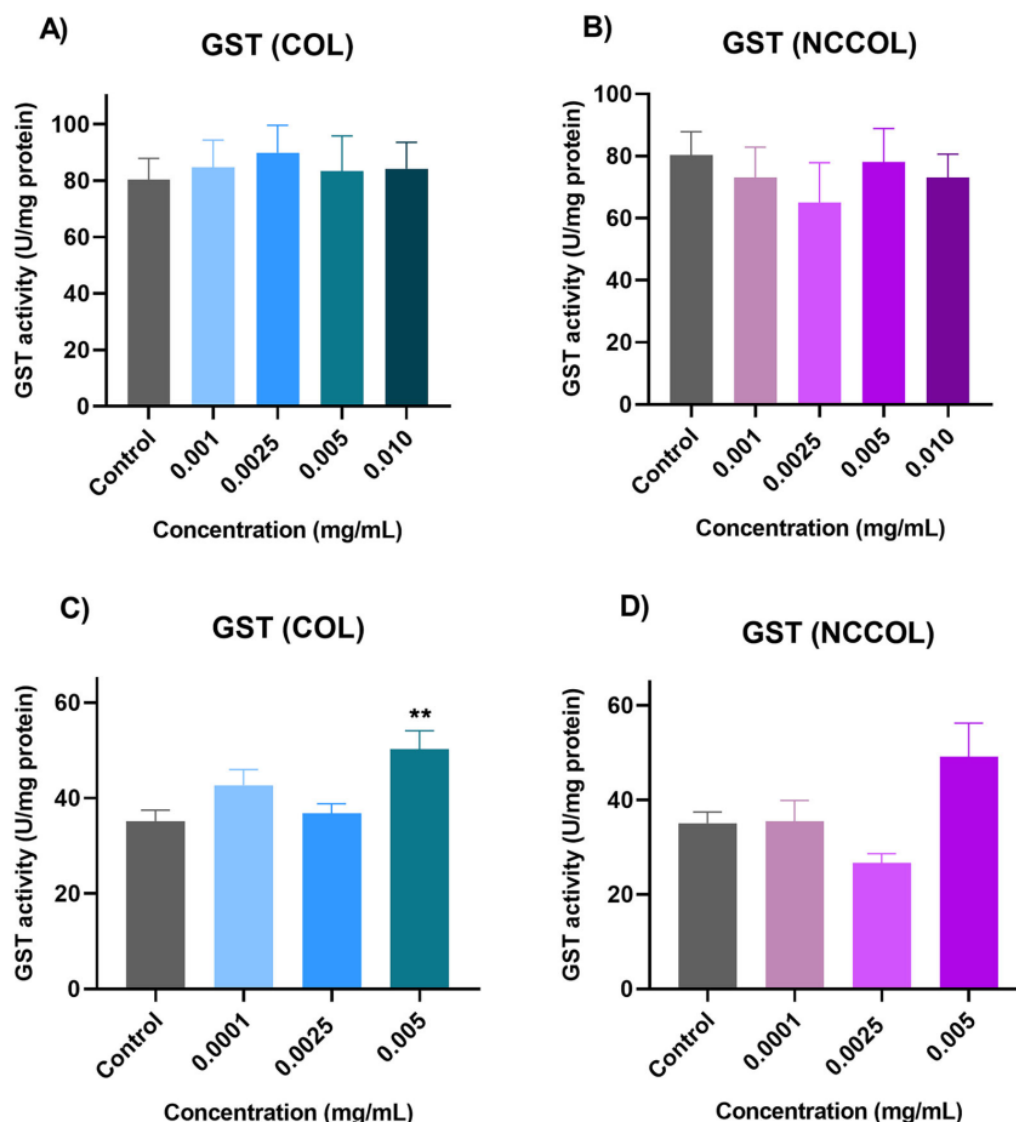


Figure 10. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to free and nanoencapsulated colchicine on the enzymatic activity of glutathione S-transferase (GST) in *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$ independent experiments). * or more: Statistical significance in relation to the control group.

NCCOL. Among several oxidative damage parameters, SOD activity in NCCOL was significantly higher during acute exposure. SOD catalyzes the dismutation of superoxide radical anions formed by the reduction of oxygen, mainly in complexes I and III of the respiratory chain. As a result of the enzymatic reaction, the O_2^- is converted into H_2O_2 and O_2 . The increase in SOD activity occurs in response to the production of superoxide radicals to balance the neutralization process of this ROS [47,48]. According to Tschopp and Schroder [49], it is described that the *Drosophila* system aims to remove O_2^- more efficiently to attenuate oxidative responses. However, in the present study, we did not analyze O_2^- levels in isolation to understand SOD performance.

Other evidence corroborates that COL has already been related to higher expression of antioxidant enzymes SOD-2 and SOD-1, with notable effects at the dose of 10 nM [49]. In contrast, in living organisms, the loss of the SOD activity is correlated with increased levels of oxidative damage, including membrane lipid peroxidation. Insufficient removal of O_2^- is deleterious [50].

Acute exposure significantly increased CAT enzymatic activity (0.001 and 0.0025 mg/mL of COL), while the chronic exposure decreased its enzymatic activity in the COL group (0.0025 and 0.005 mg/mL) and NCCOL group (0.005 mg/mL). CAT acts enzymatically by degrading H_2O_2 into water and O_2 . Although other enzymes catalyze the degradation of H_2O_2 , the lower

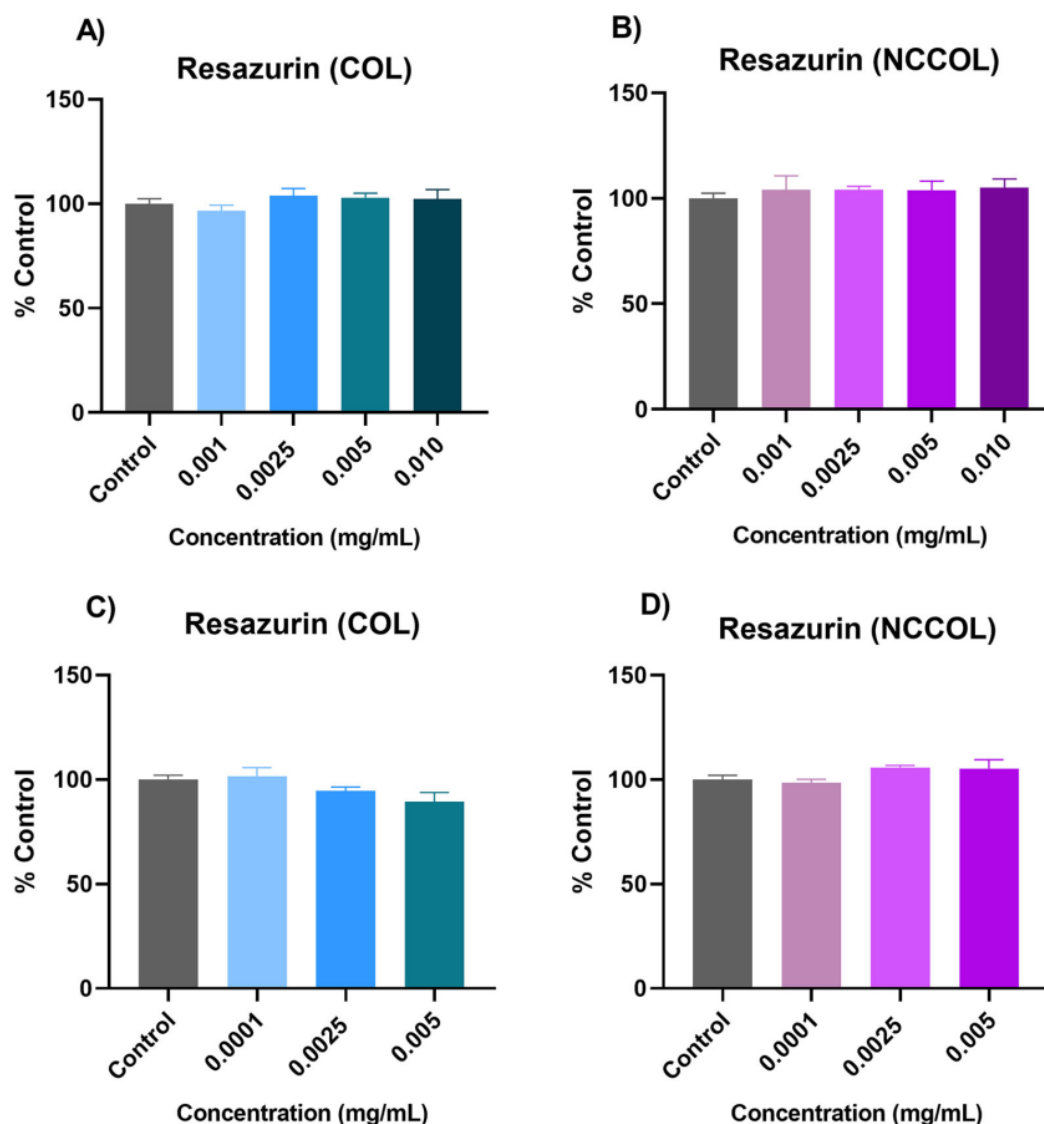


Figure 11. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to free and nanoencapsulated colchicine on cell viability of *Drosophila* by the Resazurin assay. The significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments).

activity of CAT can lead to oxidative damage, demonstrating a relevant role of CAT when there are higher levels of H_2O_2 [51]. For example, in mitochondria, the excess of H_2O_2 can react with Fe^{+2} (via Fenton reaction) and form the hydroxyl radical ($OH\bullet$), which is a highly oxidizing molecule [52].

According to Pandey et al. [43], the antioxidant activity of enzymes occurs due to the need for cellular defense of *Drosophila* in contact with nanomaterials. In a study by El-Rashid et al. [53] with C57BL/6 mice, treatment with COL reduced the production of H_2O_2 , but not O_2^- in animals with bilateral renal ischemia and reperfusion. In the present study, the levels of H_2O_2 were not evaluated, but the enzymatic activity of CAT was described.

In toxicity testing of nanomaterials, the cytotoxicity is a fundamental parameter in which assessing cell viability is necessary for all nanodrugs and component biomaterials [54]. In this research, the concentrations tested did not modify cell viability, an essential aspect as it proves that both COL and NCCOL were not harmful to the cells. Although no evidence of this parameter was found in the actual study, previously other research highlighted the role of COL in improving the viability of endothelial cells that showed some impairment in their function [40]. *In vitro* and *in vivo* assessments are extensively used to assess biocompatibility, in which the administration of the nanomaterial serves to determine whether the product exhibits cytotoxicity or other toxicological responses [55].

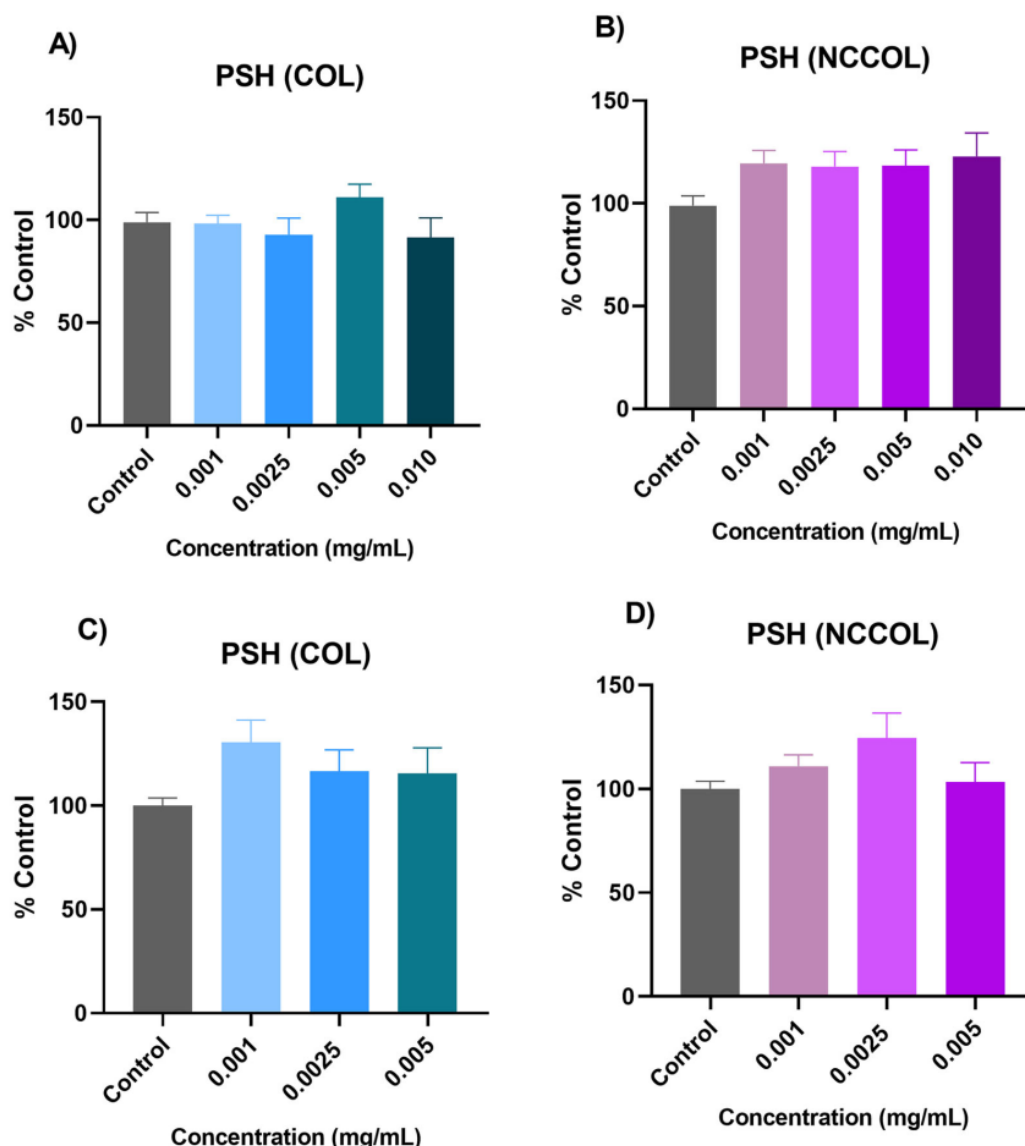


Figure 12. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to free and nanoencapsulated colchicine on protein thiols levels (PSH) of *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons (B–D). For nonparametric data the Kruskal–Wallis test (A). Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$ independent experiments).

A part of the results we found with NCCOL is due to the physicochemical properties of the nanocapsules. The toxicity of NCCOL was partially demonstrated, which was compared at equivalent concentrations with COL. The nanoencapsulation promotes greater drug efficacy, making its release slower and for a longer time, which means better delivery of the drug to cells [56]. Therefore, it is assumed that the nanoencapsulated form showed greater bioavailability in the *Drosophila* system compared to the COL. In live organisms, NCCOL, being more bioavailable, showed more prominent effects on some parameters analyzed. According to the literature, it is observed that smaller-sized nanoparticles generally exhibit greater tissue distribution and may cause collateral damage [57]. While COL modified

several oxidative parameters even at lower concentrations, NCCOL exhibited some biochemical modifications at high concentrations. Here, we highlight that the LC50 for COL was lower than for NCCOL, a positive aspect for the nanoencapsulated form meaning greater toxicity. However, the LC50 values are still approximate, possibly due to substance-related issues that should later be the subject of further studies. COL is characterized by the narrow therapeutic index, requiring critical evaluation of the dosages used in therapeutic protocols [58].

In the literature, the effects of free COL can be observed in different experimental protocols, except the *Drosophila* model. To date, no evidence has been reported on the nanoencapsulated form of this drug.

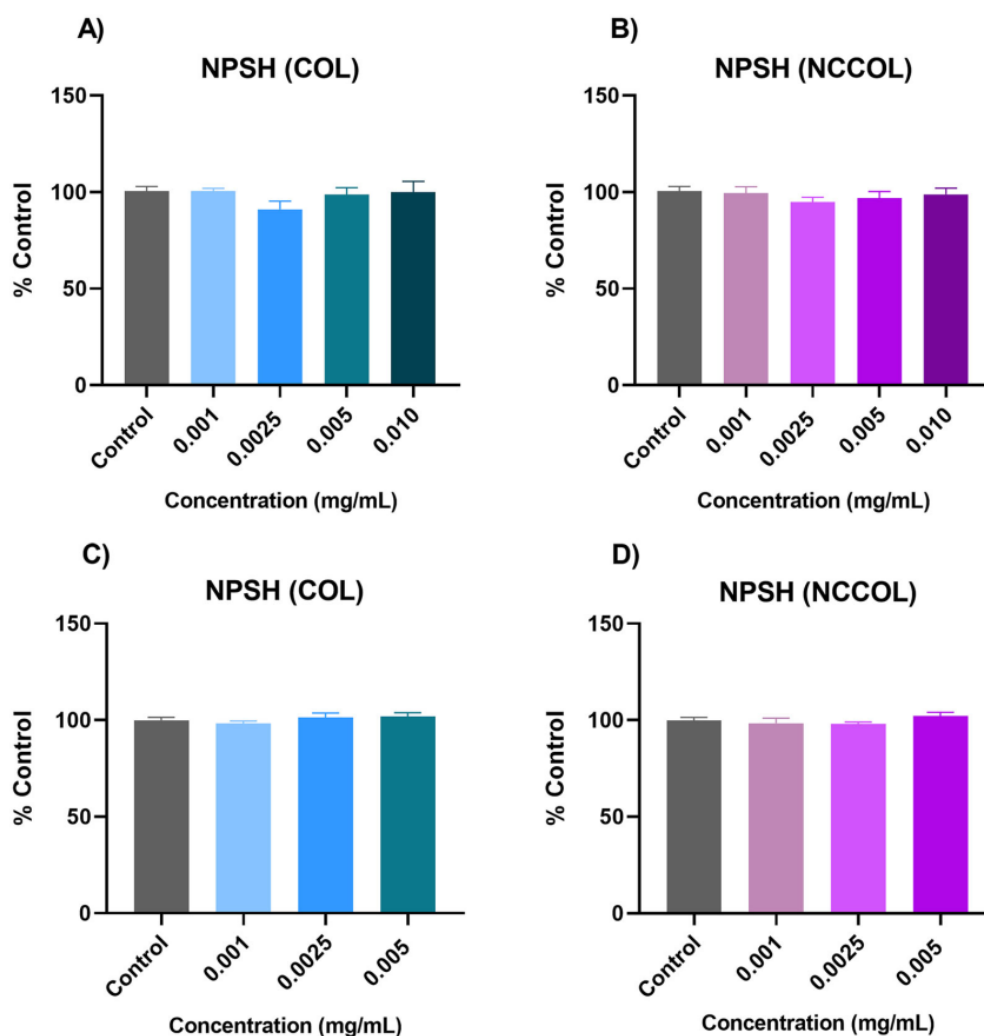


Figure 13. Effects of acute (A, B) and chronic (C, D) exposure to concentrations of free and nanoencapsulated colchicine on non-protein thiols levels (NPSH) of *Drosophila melanogaster*. The significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Values were expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$ independent experiments).

This aspect makes the insertion and safety assessment of NCCOL essential for the progression of this nanotechnology product in larger scale trials [59].

Conclusion

Our study demonstrated the toxicity of COL and NCCOL, observed in chronic exposure by their ability to affect aspects such as survival, cause locomotor impairment and induce several parameters involved in oxidative stress. In this comparative study, NCCOL caused fewer alterations to the antioxidant system and locomotor of *Drosophila* than COL. Thus, NCCOL has the advantage that nanoencapsulation favors drug efficacy and possibly requires the use of lower dosages in therapeutic practice. Finally, we highlight the involvement of oxidative stress as one of the toxicity mechanisms of

COL and NCCOL in chronic exposure, in which future research is encouraged to evaluate other nanosafety aspects of NCCOL.

Acknowledgments

This research was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); process 88881.506652/2020-01 from Edital no. 11/2020 – Seleção Emergencial “Fármacos e Imunologia”.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This research was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil (CAPES) (#88881.506652/2020-01) and Federal University of Pampa.

ORCID

Franciéle Romero Machado  <http://orcid.org/0000-0002-3574-2595>

Stéfani Machado Araujo  <http://orcid.org/0000-0002-7743-2595>

Ana Cláudia Ribeiro Funguetto  <http://orcid.org/0000-0002-5573-1076>

Vandreza Cardoso Bortolotto  <http://orcid.org/0000-0002-3043-1843>

Eliana Jardim Fernandes  <http://orcid.org/0000-0002-9451-674X>

Munir Mustafa Dahleh Mustafa  <http://orcid.org/0000-0002-5850-6739>

Sandra Elisa Haas  <http://orcid.org/0000-0002-5687-6736>

Gustavo Petri Guerra  <http://orcid.org/0000-0001-6995-5348>

Marina Prigol  <http://orcid.org/0000-0002-9724-7469>

Silvana Peterini Boeira  <http://orcid.org/0000-0001-7483-1921>

References

- [1] Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*. 2016;534(7607):314–316.
- [2] Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(1):41–58.
- [3] Han HJ, Nwagwu C, Anyim O, et al. COVID-19 and cancer: from basic mechanisms to vaccine development using nanotechnology. *Int Immunopharmacol*. 2021;90:107247.
- [4] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
- [5] Nasiripour S, Zamani F, Farasatinasab M. Can colchicine as an old anti-inflammatory agent be effective in COVID-19? *J Clin Pharmacol*. 2020;60(7):828–829.
- [6] Asselah T, Durrantel D, Pasmant E, et al. COVID-19: discovery, diagnostics and drug development. *J Hepatol*. 2021;74(1):168–184.
- [7] Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, et al. Colchicine therapy for familial Mediterranean fever: a double-blind trial. *N Engl J Med*. 1974;291(18):934–937.
- [8] Georgin-Lavialle S, Hentgen V, Stankovic Stojanovic K, et al. Familial mediterranean fever. *Rev Med Intern*. 2018;39(4):240–255.
- [9] Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clin Ther*. 2014;36(10):1465–1479.
- [10] Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. 2004;428(6979):198–202.
- [11] Lopes MI, Bonjorno LP, Giannini MC, et al. Beneficial effects of colchicine for moderate to severe COVID-19: a randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *RMD Open*. 2021;7(1):e001455.
- [12] Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med*. 2021;218:e20201707.
- [13] Gonnet M, Lethuaut L, Boury F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J Control Release*. 2010;146(3):276–290.
- [14] Kumari A, Singla R, Guliani A, et al. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI J*. 2014;13:265–286.
- [15] Pappas SA, Mishra M. A *Drosophila* model to decipher the toxicity of nanoparticles taken through oral routes. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1048:311–322.
- [16] Ong C, Yung LY, Cai Y, et al. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*. 2015;9(3):396–403.
- [17] Eriksson P, Tal AA, Skallberg A, et al. Cerium oxide nanoparticles with antioxidant capabilities and gadolinium integration for MRI contrast enhancement. *Sci Rep*. 2018;8(1):12.
- [18] Misra JR, Horner MA, Lam G, et al. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2011;25(17):1796–1806.
- [19] Venturini CG, Jäger E, Oliveira CP, et al. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids Surf A*. 2011;375(1–3):200–208.
- [20] Sood K, Kaur J, Singh H, et al. Comparative toxicity evaluation of graphene oxide (GO) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles on *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Rep*. 2019;6:768–781.
- [21] Linford NJ, Bilgir C, Ro J, et al. Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *JoVE*. 2013; (71)10.3791/50068.
- [22] Hirth F. *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010;9(4):504–523.
- [23] Pérez-Severiano F, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J, et al. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem Res*. 2004;29(4):729–733.
- [24] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351–358.
- [25] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88–95.
- [26] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*. 1984;105:121–126.
- [27] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170–3175.
- [28] Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978;90(1):81–89.
- [29] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249(22):7130–7139.
- [30] Brien J, et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of

- mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000; 267(17):5421–5426.[AQ]
- [31] Ellman A. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70–77.
- [32] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
- [33] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483–495.
- [34] Isaenko OA, Karr TL, Feder ME. Hsp70 and thermal pretreatment mitigate developmental damage caused by mitotic poisons in *Drosophila*. *Cell Stress Chaper.* 2002;7(3):297–308.
- [35] Tian H, Eom HJ, Moon S, et al. Development of biomarker for detecting silver nanoparticles exposure using a GAL4 enhancer trap screening in *Drosophila*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36(2):548–556.
- [36] Birben E, Murat U, Md S, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J.* 2012;5:9–19.
- [37] Huang HY, Appel LJ, Croft KD, et al. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3):549–555.
- [38] Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *IJMS.* 2017;18(1):120.
- [39] Mishra M, Panda M. Reactive oxygen species: the root cause of nanoparticle-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Res.* 2021;55(6):671–687.
- [40] Yang M, Lv H, Liu Q, et al. Colchicine alleviates cholesterol crystal-induced endothelial cell pyroptosis through activating AMPK/SIRT1 pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9173530.
- [41] Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Jr, et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* 2017;230:195–207.
- [42] Jahromi SR, Haddadi M, Shivanandappa T, et al. Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* in paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: biochemical and behavioral evidences. *Neurochem Res.* 2013;38(12):2616–2624.
- [43] Pandey A, Chandra S, Chauhan LK, et al. Cellular internalization and stress response of ingested amorphous silica nanoparticles in the midgut of *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(1):2256–2266.
- [44] Yasuyama K, Salvaterra PM. Localization of choline acetyltransferase-expressing neurons in *Drosophila* nervous system. *Microsc Res Tech.* 1999;45(2):65–79.
- [45] Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine.* 2007;14(4):289–300.
- [46] Moser VC. Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. *Neurotoxicol Teratol.* 2000;22(5): 713–723.
- [47] Fridovich I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):18515–18517.
- [48] Wang Y, Branicky R, Noë A, et al. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6): 1915–1928.
- [49] Tschoep J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3): 210–215.
- [50] Yang W, Li J, Hekimi S. A measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2007;177(4):2063–2074.
- [51] Mitozo PA, de Souza LF, Loch-Neckel G, et al. A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(1): 69–77.
- [52] Latunde-Dada GO. Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017;1861(8):1893–1900.
- [53] El-Rashid M, Nguyen-Ngo D, Minhas N, et al. Repurposing of metformin and colchicine reveals differential modulation of acute and chronic kidney injury. *Sci Rep.* 2020;10(1):21968.
- [54] Drasler B, Sayre P, Steinhäuser KG, et al. In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *Nano Impact.* 2017;8:99–116.
- [55] Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci.* 2010;35(10):1217–1256. 2010
- [56] Bao W, Liu R, Wang Y, et al. PLGA-PLL-PEG-Tf-based targeted nanoparticles drug delivery system enhance antitumor efficacy via intrinsic apoptosis pathway. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:557–566.
- [57] Missaoui WN, Arnold RD, Cummings BS. Toxicological status of nanoparticles: what we know and what we don't know. *Chem Biol Interact.* 2018;295:1–12.
- [58] Hirayama I, Hiruma T, Ueda Y, et al. A critically ill patient after a colchicine overdose below the lethal dose: a case report. *J Med Case Rep.* 2018;12(1):191.
- [59] Cho EJ, Holback H, Liu KC, et al. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm.* 2013;10(6):2093–2110.

6. DISCUSSÃO GERAL

Essa pesquisa teve como propósito inicial investigar os aspectos toxicológicos de nanocápsulas sem fármacos com diferentes revestimentos poliméricos e posteriormente da colchicina, comparando a forma livre e nanoencapsulada. Em proposta ao melhoramento da colchicina através de sua nanoencapsulação, esta forma farmacêutica não apresentava relatos sobre toxicidade em modelos experimentais. No **manuscrito 1** abordou-se a exposição crônica as nanocápsulas com diferentes revestimentos poliméricos (P80, PEG, CS e EUD), enquanto no **artigo 1** abordou-se a exposição aguda e crônica comparando as ambas as formas da colchicina.

Para contemplar os objetivos, o modelo da *D. melanogaster* na nanotoxicologia é um campo em expansão, uma vez que podem ser monitorados os estágios de desenvolvimento em diversos órgãos e tecidos, apresentando vantagens como a alta homologia de cerca de 70% com genes relacionados a doenças humanas (CHIFIRIUC, RATIU, POPA, & ECOVOIU, 2016). Além disso, facilita as adaptações em protocolos experimentais ao decorrer da pesquisa, tais como as concentrações finais. Dadas algumas limitações de modelos *in vitro* e computacionais, busca-se abranger modelos *in vivo* de invertebrados e empregar metodologias a fim de reduzir ou substituir os modelos de mamíferos (HOLSOPPLE *et al.*, 2023).

O manuscrito 1 aborda a exposição a quatro revestimentos poliméricos que são usados na formulação de nanocápsulas poliméricas. Assim NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD testados em quatro concentrações (10 a 500 μ L). Resultados evidenciam que volumes maiores, mesmo nas nanocápsulas brancas (sem qualquer fármaco) podem afetar os parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo na mosca exposta por 10 dias. Obviamente a inserção de volumes de 500 μ L em uma dieta de 5 ml são bastante elevados, mas diversas quantidades devem ser averiguadas. Dentre os polímeros avaliados no **manuscrito 1**, o NCP80 foi o que afetou menos parâmetros em comparação aos demais. Mesmo assim seu uso exige cautela pois 500 μ L reduziu a taxa de sobrevivência, aumentou o marcador de peroxidação lipídica e ocasionou comprometimento locomotor (**manuscrito 1**).

Em relação ao estresse oxidativo, previamente na condição *in vitro* de 10 μ g/mL ou mais de P80 foi atenuada a intensidade de fluorescência do 5-clorometilfluoresceína em timócitos de rato dependente da concentração, indicando uma diminuição no conteúdo celular de glutathiona pela P80 (HIRAMA *et al.*, 2004). Ademais, estudo *in vitro* de

TATSUSHI *et al.* (2005) utilizando o peróxido de hidrogênio em timócitos de ratos com P80 elevou a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio na condição *in vitro*, aumentando a suscetibilidade dessas células ao estresse oxidativo. Mais recentemente, OYAMA *et al.* (2010) descreveu o efeito de 10 µg/mL ou mais que aumentou a fluorescência de FluoZin-3 com um aumento na concentração intracelular de Zn (2+). Enquanto a aplicação simultânea de P80 (30 µg/mL) e ZnCl₂ (10-30 µM) elevou a letalidade celular. Em suma, o ZnCl₂ acelerou a morte celular induzida pelo P80 elevando o estresse oxidativo, mas é improvável serem coadministrados em condições clínicas. Por fim, é conhecido que a P80 pode reduzir o teor de tiol celular (OYAMA *et al.*, 2010).

Outros parâmetros como a viabilidade celular não foram significativamente alterados em concentrações de 1-100 µg/mL de P80. Já na incubação de timócitos de rato por 3 horas, somente em 300 µg/mL que a viabilidade celular foi reduzida (HIRAMA *et al.*, 2004).

A exposição crônica a outro polímero, NCPEG em maiores quantidades reduziu a taxa de sobrevivência e elevou a atividade das enzimas (CAT e GST) que atuam no sistema antioxidante. Ainda assim, a exposição é mais segura sem demais efeitos nos parâmetros mensurados (**manuscrito 1**). De acordo com PHAM *et al.* (2022) foram observados efeitos celulares, toxicidade *in vivo* em PEGs de baixo peso molecular, os quais reduziram a viabilidade celular, causaram alta osmolalidade e mortalidade das larvas. Já PEG de alto peso molecular apresentou efeito limitado sobre as células e diminuiu a osmolalidade. Ainda é relatado que outras investigações científicas devem ser realizadas para compreensão dos efeitos dos PEGs na formação de autofagossomos e apoptose.

Conforme descrito no **manuscrito 1** a NCCS teve efeitos acentuados no grupo de 500 µL (redução na taxa de sobrevivência e afetou uma série de parâmetros como ER, enzimas AchE, SOD, CAT). Nesse sentido, a baixa atividade da SOD pode ter implicado na menor atividade da CAT, uma vez que é gerado menos substrato (H₂O₂) para neutralização pela CAT (**manuscrito 1**). A toxicidade da quitosana foi abordada em estudos *in vivo*, evidenciando poucos efeitos colaterais em modelos roedores (doses de 1 a 15 g/kg/dia por 3 meses) ingeridas via oral (BALDRICK, 2010). Em relação ao perfil de segurança, depende da concentração para causar citotoxicidade e do peso molecular. O IC₅₀ é de 0,2–2,0 mg/mL na maioria dos modelos celulares (KEAN & THANOU, 2010). Estudos prévios demonstraram que a administração por via oral de quitosana demonstrou bom perfil de tolerância e segurança (BALDRICK, 2010).

Por fim, a NCEUD diferente dos demais polímeros resultou em maior número de efeitos lesivos a partir de 100 µL incluindo um maior número de moscas mortas na exposição a 10 dias, assim como aumento de ER, redução da atividade da SOD e CAT comprometendo o sistema antioxidante (**manuscrito 1**). Contrariamente ao que foi encontrado na literatura, em que pouco era conhecido sobre os aspectos tóxicos de EUD os resultados do **manuscrito 1** demonstram que deve haver cautela sobre o uso de EUD.

Por exemplo, ONISHI *et al.* (2008) compararam um sistema de entrega direcionado para doença inflamatória intestinal (DII) com quitosana (Ch)–succinil-prednisolona (SP) com microesferas conjugadas (MS) revestida com Eudragit L100 (EuL), denominada (Ch–SP-MS/EuL). A toxicidade foi maior na seguinte ordem: prednisolona, Ch–SP-MS e Ch–SP-MS/EuL, ou seja, foi menor a toxicidade com revestimento de EuL. Inclusive, a Ch-SPMS/EuL aumentou a eficácia da prednisolona e reduziu os efeitos colaterais tóxicos comparado a Ch–SP-MS. Outro estudo envolveu a inclusão do polímero EUD RL 100 em nanopartículas de poli(metilmetacrilato) (PMMA) resultando em um novo nanocarreador (PMMA-EUD). Em resumo, PMMA-EUD NPs foram captados facilmente pelas células L929 não apresentando citotoxicidade ou genotoxicidade relevante *in vitro*. Pelo contrário, PMMA NPs foram menos internalizados nas células sendo genotóxicos (GRAÇA *et al.*, 2017).

Como na literatura, os dados podem divergir do que foi encontrado no **manuscrito 1** o qual avaliou a exposição crônica e maiores quantidades, ainda pouco é relatado da toxicidade de EUD em organismos vivos até o momento. Para todos os polímeros aqui estudados evidencia-se o prosseguimento de estudos envolvendo a toxicologia, visto sua inserção constante em nanoformulações.

Enquanto para o estudo sobre a nanoencapsulação da colchicina definiram-se as concentrações em 0,001, 0,0025, 0,005 e 0,010 mg/mL de COL ou NCCOL (**artigo 1**). Na literatura um achado foi encontrado com colchicina em meio de cultura de moscas com 0,1 para 100 partes por milhão (ppm) (KOCH & SPITZER, 1983). Como foco principal do **artigo 1** era a comparação das formas da colchicina, antes de definir o protocolo experimental definitivo testaram-se diferentes concentrações, sem incluir valores previamente utilizados. Resultados apontam que ambas as formas da colchicina foram deletérias a mosca em altas concentrações (0,005 e 0,010 mg/mL), com mortalidade acentuada na exposição crônica. Para fins de comparação, a exposição aguda de 0,010 mg/mL ainda é segura, mas à medida que a exposição é prolongada uma menor taxa de sobrevivência pode ser observada (**artigo 1**).

De forma geral, moscas expostas agudamente a COL tiveram comprometimento locomotor e aumento da atividade da enzima CAT. Em contrapartida, NCCOL reduziu os níveis de ER, mas elevou o marcador de peroxidação lipídica e a atividade da SOD (**artigo 1**). A exposição crônica a COL e NCCOL em elevadas concentrações causou alta mortalidade e inibição de enzimas como CAT e AChE, sendo que COL causou comprometimento locomotor, diferente de NCCOL. Resumidamente nesse estudo comparativo, NCCOL foi menos lesivo ao sistema antioxidante comparado a COL (**artigo 1**). A exposição por 10 dias na área de nanopartículas e nanomateriais previamente já foi abordada nesse modelo experimental (ANAND *et al.*, 2017). Além disso, estudos com *D. melanogaster* ofereceram referencial teórico para uma abordagem na área. De acordo com SING *et al.* (2020) que avaliou a nanotoxicidade após a exposição a nanopartículas de prata (AgNPs) a exposição crônica ocasionou diversos efeitos prejudiciais como maior mortalidade do estágio larval ao adulto, atividade comportamental e metabólica comprometida, estresse oxidativo induzido, apoptose e expressão alterada da proteína de choque térmico 70 kDa (Hsp70) (SING *et al.*, 2010; AHAMED *et al.*, 2010; MAO, *et al.*, 2018).

Previamente a escolha dos fármacos alvos, os pesquisadores precisam compreender os possíveis mecanismos de combate à doença. Por exemplo, sua atuação pode ser na regulação de respostas imunes, inibindo a polimerase viral ou constituindo como um fator crítico para as primeiras etapas da infecção (ligação da proteína S ao ACE2). Dentre os fármacos promissores para o tratamento da Covid-19 estão inclusos o Lopinavir, Arbidol, ritonavir, Tocilizumab, Cloroquina / Hidroxicloroquina, Remdesivir, e a colchicina (MAJUMDER & MINKO, 2021).

Pesquisas prévias com a colchicina reforçaram seu potencial farmacológico contra o processo inflamatório, como achados que apontam que na inflamação no tecido cardíaco, por exemplo, a administração aguda reduziu a produção transcoronária das citocinas específicas do inflamassoma como IL-1 β , IL-18 e IL-6 nos pacientes com síndromes coronárias agudas. Os autores evidenciam uma provável função como agente terapêutico para suprimir de forma aguda a inflamação associada à aterosclerose (MARTÍNEZ *et al.*, 2015). FUJISUE *et al.* (2017) descreveu que após 24 horas do infarto do miocárdio, ocorreu acréscimo das expressões mRNA de componentes do inflamassoma NLRP3 (NLRP3, proteína adaptadora ASC, caspase-1) na área infartada. De fato, a colchicina evitou ativação do inflamassoma NLRP3, atenuou a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias e elevou a atividade da caspase-1 24h após o infarto

do miocárdio. Nesse estudo com camundongos administraram-se via oral (0,1 mg/kg/ dia de colchicina de 1 hora a 7º dia após o infarto do miocárdio), apresentando em análise histológica inibição significativa da infiltração de neutrófilos e macrófagos.

Por fim, as duas pesquisas (**Manuscrito 1 e Artigo 1**) estão interligadas pois avaliam a nanotoxicidade, seja nanocápsulas sem fármaco avaliadas com quatro tipos de revestimentos e de nanocápsulas com fármacos (NCCOL). Esse achado ao mesmo tempo corrobora com os resultados da NCCOL, que em sua formulação utiliza o P80, evidenciando a nanosseguurança desse polímero.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados discutidos ao longo da tese, foram evidenciadas as questões toxicológicas envolvendo o uso de nanoformulações *in vivo*, como as nanocápsulas poliméricas com diferentes tipos de revestimentos e nanocápsulas de colchicina.

Foram apresentados resultados de quatro revestimentos poliméricos (NCP80, NCPEG, NCCS e NCEUD), nos quais as nanocápsulas sem fármacos podem exercer algum tipo de alteração quando empregada em maiores quantidades de forma crônica. Dentre os revestimentos, NCEUD modificou diversos parâmetros do estresse oxidativo e causou deficiências locomotoras. Por outro lado, a NCP80 também modificou alguns parâmetros, mas somente em concentrações elevadas. Ressalta-se que a NCP80 foi o revestimento escolhido para a formulação das nanocápsulas de colchicina, comprovando que esse revestimento polimérico não interferiu nos resultados da NCCOL. Posteriormente a nanoencapsulação da colchicina foi proposta, mas antes de abordar os aspectos terapêuticos de novos produtos da nanotecnologia, compreendeu-se sua toxicologia através de organismos como a *Drosophila*. Por fim na comparação entre a forma livre e nanoencapsulada da colchicina os achados fundamentaram a hipótese de que a nanoencapsulação evidenciou menores efeitos toxicológicos comparado a forma livre, embora deva ser utilizada com cautela. Por fim, atingiu seu objetivo pois destacou a importância de avaliar essas nanoformulações em organismos vivos, evidenciando a relação entre o estresse oxidativo e a toxicologia dessas substâncias.

8. PERSPECTIVAS

Como propósito para pesquisas futuras pretende-se pesquisar sobre os modelos de indução de inflamação em *D. melanogaster*, a fim de poder avaliar a atuação da colchicina nanoencapsulada em modelos inflamatórios. Além disso, também seria de interesse para trabalhos posteriores compreender outros aspectos como efeitos na reprodução e descendência das moscas após exposição a NCCOL. Com essas perspectivas espera-se corroborar com os resultados aqui demonstrados fornecendo mais evidências quanto ao uso de NCCOL.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCHOWSKI, A. *et al.* Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. **The Journal of biological chemistry**. v.252, p.3582-6, 1977.

ADAMS *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. v.287, p.2185-2195, 2000.

AGARRAYUA, D.A. *et al.* Safety assessment of different unloaded polymeric nanocapsules in *Caenorhabditis elegans*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v.263, p.109477, 2023.

ANDRETIC, R. *et al.* *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.105, p. 20392–20397, 2008.

APIDIANAKIS, Y; RAHME, L.G. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. **Dis Model Mech.**, v. 4, n.1, p. 21–30, 2011.

APOSTOLIDOU, E; SKENDROS, P; KAMBAS, K. *et al.* Neutrophil extracellular traps regulate IL-1(-mediated inflammation in familial Mediterranean fever. **Ann Rheum Dis**. v.75, p. 269–277, 2016.

BAGDE A. *et al.* Singh M. Sustained release dosage form of nescapine HCl using hot melt extrusion (HME) technique: Formulation and pharmacokinetics. **Drug Deliv. Transl. Res**. v.11, p.1156–1165, 2021.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regul Toxicol Pharmacol: RTP**. p.56, p. 290–299, 2010.

BANGI, E. *Drosophila* at the intersection of infection, inflammation, and cancer. **Front Cell Infect Microbiol**. v.3, n.103, 2013

BAVISHI, C; MADDOX, T.M; MESSERLI, F.H. Coronavirus Disease 2019 (COVID 19) Infection and Renin Angiotensin System Blockers. **JAMA Cardiol**. v.5, n.7, 2020.

BAYDA, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**. v.25, n.1, p.112, 2019.

BEBER, T.C. *et al.* Cationic Polymeric Nanocapsules as a Strategy to Target Dexamethasone to Viable Epidermis: Skin Penetration and Permeation Studies. **J. Nanosci. Nanotechnol**. v.16, p.1331–1338, 2016.

BELBEKHOUCHE, S. *et al.* Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent. **Colloids Surf. B**. v.181, p.158–165, 2019.

BEN-CHETRIT, E; BERGMANN, S; SOOD, R. Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. **Rheumatology**. v.45, p.274–82, 2006.

BERKUN, Y. *et al.* Pharmacokinetics of colchicine in pediatric and adult patients with familial Mediterranean fever. **Int J Immunopathol Pharmacol.** v.25, p.1121–30, 2012.

BONAVENTURA, A. *et al.* Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. **Nat Rev Immunol.** V.21, n.5, p.319-329, 2021.

BOROS, B.V; OSTAFE, V. Evaluation of Ecotoxicology Assessment Methods of Nanomaterials and Their Effects. **Nanomaterials (Basel).** v.10, n.4, p. 610, 2020.

BRANDNER, J.D. The composition of NF-defined emulsifiers: Sorbitan monolaurate, monopalmitate, monostearate, monooleate, polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60, and polysorbate 80. **Drug Dev Ind Pharm.** v. 24, p.1049–1054, 1998.

BRIGGER, I; DUBERNET, C; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev.** v.1354, n.5, p. 631-51, 2002.

BRUNTON, L. *et al.* **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.** 10 ed. Rio de Janeiro, 2005.

CHEAH, W.Y. *et al.* Antibacterial activity of quaternized chitosan modified nanofiber membrane. **Int J Biol Macromol.** v.1, n.126, p.569-577, 2019.

CHEN, B. *et al.* Overview of lethal human coronaviruses. **Signal Transduct Target Ther.** v.5, n.1, p. 89, 2020.

CHEN, C.K. *et al.* Biodegradable cationic polymeric nanocapsules for overcoming multidrug resistance and enabling drug-gene co-delivery to cancer cells. **Nanoscale.** v.6, n.3, p.1567-72, 2014.

CHENG, V.C.C. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. **Clin Microbiol Rev.** v.20, n.4, p.660-94, 2007.

CHEN, W. H. *et al.* The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. **Curr. Trop. Med. Reports.** v.7, n.2, p.61–64, 2020.

CHIA, E.W; GRAINGER, R; HARPER, J.L. Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis: a rationale for use of low-dose colchicine. **Br J Pharmacol.** v.153, n.6, p.1288-95, 2008.

COORS, E.A. *et al.* Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. **Ann Allergy Asthma Immunol,** v.95, n.6, p.593-9, 2005.

COSTA A. *et al.* The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. **Plos One.** V.4, p.e7436, 2009.

DALBETH, N; LAUTERIO, T.J; WOLFE, H.R. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. **Clin Ther.**v.36, n.10, p.1465-1479, 2014.

- DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**. V.10, n.2, p.57, 2018.
- DIAMANTAKIS, O *et al.* Pregnancy outcome after in utero exposure to colchicine. **Am J Obstet Gynecol** v.203:144 e1–e6, 2010.
- DINARELLO, C.A *et al.* Colchicine therapy for familial Mediterranean fever: a double-blind trial. *N Engl J Med*. v. 291, p.934–937, 1974.
- DOKTOROVA, S. *et al.* Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. **Eur J Pharm Biopharm**. v.87, n.1, p.1-18. 2014.
- DOS SANTOS, N *et al.* Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1768, p. 1367–1377, 2007.
- DOS SANTOS, *et al.* Eudragit®: A Versatile Family of Polymers for Hot Melt Extrusion and 3D Printing Processes in Pharmaceuticals. **Pharmaceutics**. v.13, n. 9, p.1424, 2021.
- D'SOUZA, A.A; SHEGOKAR, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv*. v.13, n.9, p.1257-1275, 2016.
- DUNCAN, R; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the microscope. **Mol Pharm**.v. 8, p. 2101–2141, 2011.
- FAN, Y. *et al.* Bat coronaviruses in china. **Viruses**. v.11, n.210, p.14, 2019.
- FAROKHZAD, O.C; Langer, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**. v.3, n.1, p.16-20, 2009.
- FERRARI, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. **Nat. Rev. Cancer**. v.5, p.161–171, 2005.
- FERRON, G.M *et al.* Oral absorption characteristics and pharmacokinetics of colchicine in healthy volunteers after single and multiple doses. **J Clin Pharmacol** v.36, p.874–883.
- FONG, A; DURKIN, A; LEE, H. The Potential of Combining Tubulin-Targeting Anticancer Therapeutics and Immune Therapy. **Int J Mol Sci**. v.20, n.3, p.586, 2019.
- FRANK, L.A *et al.* Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **Int J Nanomedicine**.v.28, n.9, p. 3151-61, 2014.
- FRUITIER-PÖLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology**. v.214, n.1-2, p.1-38, 2005.
- FUJISUE, K. *et al.* Colchicine Improves Survival, Left Ventricular Remodeling, and Chronic Cardiac Function After Acute Myocardial Infarction. **Circ J**. v.81, n.8, p.1174-1182, 2017.

GRAÇA, D. *et al.* Toxicity screening of a novel poly(methylmethacrylate)-Eudragit nanocarrier on L929 fibroblasts. **Toxicol Lett.** v.276, p.129-137, 2017.

GREF, R. *et al.* Biodegradable Long Circulating Polymeric Nanospheres. **Science.**v.263, p. 1600–1603, 1994.

HALDORAI, Y. *et al.* Properties of chitosan/magnetite nanoparticles composites for efficient dye adsorption and antibacterial agent. **Korean J. Chem. Eng.** v.32, p.1688–1693, 2015.

HAN, H.J. *et al.* COVID-19 and cancer: From basic mechanisms to vaccine development using nanotechnology. **Int Immunopharmacol.** v. 90, p.107247, 2021.

HANDFORD, C.E. *et al.* Implications of nanotechnology for agri-food industry: opportunities, benefits and risks. **Trends Food Sci Technol.** v.40, p.226–241, 2014.

HENTGEN, V. *et al.* Evidence-based recommendations for the practical management of familial Mediterranean fever. **Semin Arthritis Rheum.** v.43, p.387–91, 2014.

HIRAMA, S. *et al.* Flow-cytometric analysis on adverse effects of polysorbate 80 in rat thymocytes. **Toxicology.**v.199, p. 137–143, 2004.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** v.9, p.504-523, 2010.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell.** v.181, n.2, p.271-280, 2020.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet.** v.395, n.10223, p.497-506, 2020.

HUANG, Y.W; CAMBRE, M; LEE, H.J. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. **Int J Mol Sci.** v.18, n.12, p.2702, 2017.

ISLAM, N; DMOUR, I; TAHA, M.O. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Heliyon.** v.5, p. e01684, 2019.

JA, W.W. *et al.* Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.104, n.20, p.8253-6, 2007.

JIANG, S. *et al.* Oral administration and selective uptake of polymeric nanoparticles in *Drosophila* larvae as an in vivo model. **ACS Biomater Sci Eng.** v.1, n.11, p.1077–1084, 2015.

KACZMAREK, M.B. *et al.* Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitoooligosaccharides. **Front Bioeng Biotechnol.** v.27, p.237-:243, 2019

KALLINICH, T. *et al.* Colchicine use in children and review and consensus statement. **Pediatrics**. v.119, p.474–83, 2007.

KARAMANOU, M. *et al.* Isolating Colchicine in 19th Century: An Old Drug Revisited. **Curr Pharm Des**. v.24, n.6, p.654-658, 2018.

KEAN, T; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Adv Drug Delivery Rev**. v.62, p.3–11, 2010.

KERWIN, B.A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. **J Pharm Sci**.v.97, n.8, p.2924–2935, 2008.

KIM, B.S; PARK, S. W; HAMMOND, P. T. Hydrogen-Bonding Layer-by-Layer-Assembled Biodegradable Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles from Surfaces. **ACS Nano**. v.2, p. 386–392, 2008.

KISHORI, L.D; NILIMA, A.T; PARAAG, S.G. Formulation and development of tinidazole microspheres for colon targeted drug delivery system. **J Pharm Res**. v.5, p.158–60, 2013.

KRAUSE J. *et al.* Design and characterization of a novel 3D printed pressure-controlled drug delivery system. **Eur. J. Pharm. Sci**. v.140, p.105060, 2019.

KRITCHENKOV A.S. *et al.* Novel non-toxic high efficient antibacterial azido chitosan derivatives with potential application in food coatings. **Food Chem**. V.301, p.125247, 2019.

KUDRYAVTSEVA, A.V. *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. **Oncotarget**.v.7, n.29, p.44879-44905, 2016.

KUMARI, A; YADAV, S.K. Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles. **Expert Opin Drug Deliv**. v.8, n.2, p.141-51, 2011.

KUMARI, A. *et al.* Nanoencapsulation for drug delivery. **EXCLI J**. v.13, p.265-286, 2014.

KURAISHI, T. *et al.* Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci**. v.108, n.38, p.15966–15971, 2011.

LANGER R, FOLKMAN J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. **Nature**. v.263, n.5580, p.797-800, 1976.

LE BOURG, E. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. **FEBS Lett**.v.498, n.2-3, p.183-186, 2001.

LEE, D.W. *et al.* Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. **Blood**. v.124, n.2, p.188-195, 2014.

- LI, X. *et al.* Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of hematology & oncology**. v.6, p. 19, 2013.
- MAHMOOD, A. *et al.* Thiolated chitosan micelles: Highly mucoadhesive drug carriers. **Carbohydr. Polym.** v.167, p. 250–258, 2017.
- MAJUMDER, J; MINKO, T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **AAPS J.** v.23, n.1, p.14, 2021.
- MARTÍNEZ, G.J. *et al.* Colchicine Acutely Suppresses Local Cardiac Production of Inflammatory Cytokines in Patients With an Acute Coronary Syndrome. **J Am Heart Assoc.** v. 4, n.8, p.002128, 2015.
- MCKIMM-BRESCHKIN, J.L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. **Influenza Other Respir Viruses.** v.7, n.1, p.25-36, 2013.
- MERKLING, S. H; VAN RIJ, R.P. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. **J.Insect.Physiol.**v.59, p.159–170, 2013.
- MISAWA, T. *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. **Nat Immunol.** v.14, p.454–460, 2013.
- MOHAMMADI-JAM, S; WATERS, K.E; GREENWOOD, R.W. A review of zeta potential measurements using electroacoustics. **Adv Colloid Interface Sci.** v.309, p.102778, 2022.
- NASIRIPOUR, S; ZAMANI, F; FARASATINASAB, M. Can Colchicine as an Old Anti-Inflammatory Agent Be Effective in COVID-19? **J Clin Pharmacol.** v.60, n.7, p.828-829, 2020.
- NIDORF, S.M; EIKELBOOM, J.W; THOMPSON, P.L. Targeting cholesterol crystal-induced inflammation for the secondary prevention of cardiovascular disease. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** v.19, p.45–52, 2014.
- ONG, C. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology.** v.9, n.3, p.396-403, 2015.
- ONISHI, H; OOSEGI, T; MACHIDA, Y. Efficacy and toxicity of Eudragit-coated chitosan-succinyl-prednisolone conjugate microspheres using rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis. **Int J Pharm.**v.358, n.1-2, p.296-302, 2008.
- OYAMA, T.M. *et al.* Zinc at clinically-relevant concentrations potentiates the cytotoxicity of polysorbate 80, a non-ionic surfactant. **Toxicol In Vitro.** v.24, n.3, p.737-744, 2010.
- OZEN, S. *et al.* EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. **Ann Rheum Dis.** v.75, p.644–51, 2016.

- OZLU, B. *et al.* Controlled release of doxorubicin from polyethylene glycol functionalized melanin nanoparticles for breast cancer therapy: Part I. Production and drug release performance of the melanin nanoparticles. **Int J Pharm.** v.30, p. 118613, 2019.
- PANDEY, U.B; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacol Rev.** v.63, n.2, p. 411-36, 2011.
- PAPPUS, S.A; MISHRA, M. A *Drosophila* Model to Decipher the Toxicity of Nanoparticles Taken Through Oral Routes. **Adv Exp Med Biol.** v.1048, p.311-322, 2018.
- PARK, J.B. *et al.* Process analytical quality control of tailored drug release formulation prepared via hot-melt extrusion technology. **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v.38, p.51–58, 2017.
- PARVATHI, D; AMRITHA, A; PAUL, S.F.D. Wonder Animal Model for Genetic Studies – *Drosophila melanogaster* – its life cycle and breeding methods – A review. **Sri Ramachandra Journal of Medicine**, v.2, p.33-38, 2009.
- PASCHKE, S, *et al.* Technical advance: inhibition of neutrophil chemotaxis by colchicine is modulated through viscoelastic properties of subcellular compartments. **J Leukoc Biol.** v.94, p.1091–6, 2013.
- PASUT, G; VERONESE, F.M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society.** v.161, p. 461-72, 2012.
- PATIL, Y.B. *et al.* Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. **Biomaterials.** v.30, n.5, p. 859-866, 2009.
- PATRA, C.N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Futur. J. Pharm. Sci.**v.3, p. 33–45, 2017.
- PAVONI, J.M.F; LUCHESE, C.L; TESSARO, I.C. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films. **Int. J. Biol. Macromol.**v.138, p. 693–703, 2019.
- PERALTA, M.F. *et al.* Efficacy of topical risedronate and risedronate—Eudragit E complex in a model of cutaneous leishmaniasis induced by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Heliyon.**v.7, p. e07136, 2021.
- PHAM, L. *et al.* Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives. **Polymers (Basel).** v.14, n.2, p.279, 2022.
- PIZZINO, G *et al.* Oxidative stress: Harms and benefits for human health. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, n. 8416763, p. 1-13, 2017.

PRIDGEN, E.M; ALEXIS, F; FAROKHZAD, O.C. Polymeric Nanoparticle Technologies for Oral Drug Delivery. Clin. Gastroenterol. **Hepatol.** v.12, n.10, p.1605–1610, 2014.

RAVELLI RB. *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. **Nature.** v.428, n.6979, p.198-202, 2004.

RAY, P.D; HUANG, B.W; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling.** v.24, p.981–990, 2012.

RAZMI, F.A. *et al.* Kinetics, thermodynamics, isotherm and regeneration analysis of chitosan modified pandan adsorbent. **J. Clean. Prod.** v.231, p. 98–109, 2019.

REYES, A.Z. *et al.* Anti-inflammatory therapy for COVID-19 infection: The case for colchicine. **Annals of the Rheumatic Diseases.** v.80, p.550–557, 2021.

ROCHDI, M. *et al.* Pharmacokinetics and absolute bioavailability of colchicine after i.v. and oral administration in healthy human volunteers and elderly subjects. **Eur J Clin Pharmacol.** v.46, p.351–354, 1994.

RODRÍGUEZ, J. *et al.* Current encapsulation strategies for bioactive oils: from alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Res Int.** v.83, p.41–59, 2016.

SAMPEDRO-NÚÑEZ M. *et al.* Analysis of expression of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint system and its prognostic impact in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. **Sci. Rep.** v.8, p.17812, 2018.

SANTOS, P.P. *et al.* Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends Food Sci Technol.** v.53, p.23–33, 2016.

SAVAGE, D. *et al.* In Vitro Methods for Assessing Nanoparticle Toxicity. **Methods Mol Biol.** v.1894, p. 1-29, 2019.

SCHWIRN, K. *et al.* Environmental Risk Assessment of Nanomaterials in the Light of New Obligations Under the REACH Regulation: Which Challenges Remain and How to Approach Them. **Integr Environ Assess Manag.** v.16, n.5, p. 706-717, 2020.

SHI, Y. *et al.* COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death Differ.** v.27, p.1451–1454, 2020.

SHIN, T.H. *et al.* Integration of metabolomics and transcriptomics in nanotoxicity studies. **BMB Rep.** v.51, n.1, p.14-20, 2018.

SIDDIQUE, Y.H. *et al.* Toxic potential of copper-doped ZnO nanoparticles in *Drosophila melanogaster* (Oregon R). **Toxicol Mech Methods.** v.25, n.6, p.425-432, 2015.

SIES, H; JONES, D.P. **Oxidative stress.** In: **Encyclopedia of Stress (2nd ed.)**, edited by Fink G: Elsevier. p. 45–48, 2007.

SINGH, A.V. *et al.* Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. **Toxicol Mech Methods**. v.29, n.5, p. 378-387, 2019.

SLOBODNICK A. *et al.* Update on colchicine, 2017. **Rheumatology**. v.57, n.1, p.4-11, 2018.

TATEISHI, T. *et al.* Colchicine biotransformation by human liver microsomes. Identification of CYP3A4 as the major isoform responsible for colchicine demethylation. **Biochem Pharmacol**. v.53, n.1, p.111-116, 1997.

TATSUSHI, T. *et al.* Polysorbate 80 increases the susceptibility to oxidative stress in rat thymocytes. **Toxicology**.v.207, n.1, p. 7–14, 2005.

THAKRAL, S; THAKRAL, N.K; MAJUMDAR, D.K. Eudragit®: A technology evaluation. **Expert Opin. Drug Deliv**. v.10, p.131–149, 2013.

ten TIJE, A.J. *et al.* Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. **Clin Pharmacokinet**. v.42, n.7, p. 665–685, 2003.

TERKELTAUB, R.A. *et al.* Novel evidencebased colchicine dose-reduction algorithm to predict and prevent colchicine toxicity in the presence of cytochrome P450 3A4/P-glycoprotein inhibitors. **Arthritis Rheum**. v.63, p.2226–37, 2011.

VAN BALLEGOOIE, C. *et al.* PEG Conjugated Zein Nanoparticles for In Vivo Use. **Pharmaceutics**.v.14, n.9, p.1831, 2022.

WANG, W. *et al.* Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. **Int J Mol Sci**.v.21, n.2, p. 487, 2020.

WANG, J. *et al.* Nano-titanium nitride causes developmental toxicity in zebrafish through oxidative stress. **Drug Chem Toxicol**. v.45, n.4, p.1660-1669, 2022.

WANGLER, M.F; YAMAMOTO, S; BELLEN, H.J. Fruit flies in biomedical research. **Genetics**. v.199, n.3, p.639-53, 2015.

WEISZHAR, Z. *et al.* Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. **Eur J Pharm Sci**. v.45, n.4, p.492–498, 2012.

WOO, P. C. *et al.* Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J Virol**. v.86, n.7, p.3995-4008, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2020) Rolling updates on coronavirus disease (COVID-19). Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>. Acesso em 10 de abril de 2021.

WOLF, Y.I. Origins and Evolution of the Global RNA Virome. **MBio**. v.9, n.6, 2018

WU, Z; MCGOOGAN, J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. **JAMA**. v.323, p.1239–1242, 2020.

XIA, Y. *et al.* Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. **Vacina**. v. 33, p.5997–6010, 2015.

XIAO, X.F; JIANG, X.Q; ZHOOU, L.J. Surface Modification of Poly Ethylene Glycol to Resist Nonspecific Adsorption of Proteins. **Chinese journal of Analytical Chemistry**.v.41, p. 445-53, 2013.

XU L. *et al.* Identification of novel metabolites of colchicine in rat bile facilitated by enhanced online radiometric detection. **Drug Metab Dispos**. v.36, n.4, p.731-9, 2008.

YU, S. *et al.* *Drosophila* Innate Immunity Involves Multiple Signaling Pathways and Coordinated Communication Between Different Tissues. **Front Immunol**. v.7, n.13, p. 905370, 2022.

YUN, Y; CHO, Y.W; PARK, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Adv Drug Deliv Rev**. v.65, n.6, p.822–832, 2013.

ZEMER, D. *et al.* A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial Mediterranean fever. **N Engl J Med**. v.291, p.932–4, 1974.

ZEMER, D. *et al.* Long-term colchicine treatment in children with familial Mediterranean fever. **Arthritis Rheum**. v.34, p.973–7, 1991.

ZHU, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**. v.382, n.8, p.727–733, 2020.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-By-Design and Testing at a Glance. **Int J Environ Res Public Health**.v.17, n.13, p. 4657, 2020.