

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

CLÁUDIO SÉRGIO DA COSTA

**EFEITO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM CREATINA QUINASE
E CADEIA RESPIRATÓRIA CELULAR.**

CRICIÚMA (SC), ABRIL DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CLÁUDIO SÉRGIO DA COSTA

**EFEITO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM CREATINA QUINASE
E CADEIA RESPIRATÓRIA CELULAR.**

Projeto de Mestrado do Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde para obtenção
do Título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Marques de Paula
Co-orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA (SC), ABRIL DE 2009

Dedico este trabalho a Deus, a meus amores Mariana e Luiza que sempre acreditaram em mim e me deram apoio, força e coragem para prosseguir e completar mais esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, por ter me permitido nascer numa família maravilhosa e por todas as oportunidades.

Agradeço aos meus pais que sempre acreditaram nos meus sonhos. Sempre me apoiando, incentivando e mostrando a importância do conhecimento e de todo o esforço.

A minha esposa e filha Luiza e Mariana por serem meu porto seguro e luz no meu caminho, por me aturar todos estes anos, ser paciente, compreensiva e me apoiar incondicionalmente – AMO VOCÊS.

Aos meus amigos e colegas (fisioterapeutas e professores) sem esquecer dos colegas de mestrados, pelo respeito, pela paciência, ajuda e por todos os conhecimentos compartilhados ao longo destes anos.

Aos Professores Dr. Marcos Marques de Paula e Dr. Emílio Streck, pela amizade, dedicação, disponibilidade, competência, paciência, ética, excelente orientação, ensinamentos, pela paciência e por confiar a mim sua orientação neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Síntese de Novos Complexos Multifuncionais e Laboratório de Fisiopatologia Experimental, cada um de vocês sabe que serei eternamente grato pela ajuda nos experimentos e realização deste trabalho.

Enfim, agradeço aqueles que direta ou indiretamente, estiveram juntos nessa caminhada e que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desse sonho.

Obrigado a todos.

“Além da nossa própria vida e de todos os obstáculos vencidos, talvez o maior desafio em tudo seja compreendermos o verdadeiro e único sentido das coisas que nos rodeiam”.

Cláudio (Poeta) Sérgio da Costa

RESUMO

As nanopartículas de prata (AgN) são nanoproductos importantes uma vez que a prata exhibe propriedades físicas, químicas e biológicas notadamente distintas. A prata tem sido utilizada há anos na medicina; ela possui propriedades antimicrobiais conhecidas e parece até mesmo prevenir a ligação do HIV com as células hospedeiras. Além disso, a prata tem sido utilizada na água e na filtração do ar para eliminar os microorganismos, e, mais recentemente, como um biocida para prevenir a infecção em queimados, ferimentos por trauma e úlceras diabéticas. Outros usos incluem o aquecimento de cateteres e outros utensílios médicos implantados sobre ou dentro do corpo. Em contato com o corpo humano, as nanopartículas podem precipitar um espectro de respostas tissulares tais como a geração de espécies reativas de oxigênio, diminuição da função da mitocôndria e até mesmo a morte celular. Creatina quinase (CK) desempenha um papel central no metabolismo de tecidos que consomem muita energia, tais como o cérebro, músculo esquelético e coração, funcionando como um efetivo sistema tampão dos níveis de ATP celular. Uma diminuição na atividade da CK pode alterar a homeostase energética, contribuindo para a morte celular. Mitocôndrias são organelas intracelulares que desempenham um papel crucial na produção ATP. No presente trabalho, objetiva-se avaliar o efeito *in vitro* da AgN sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial de cérebro, músculo esquelético, coração e fígado de ratos e atividade da CK de cérebro, coração e músculo esquelético de ratos. Nossos resultados demonstram que AgN (10, 25 e 50 mg L⁻¹) diminui a atividade da cadeia respiratória mitocondrial complexos I, II, III e IV de todos os tecidos já na atividade da CK foram inibidos em cérebro e músculo esquelético, porém não em coração. Os tecidos com grandes necessidades energéticas, tais como o cérebro, músculo esquelético, coração e fígado, contêm grande número de mitocôndrias e são altamente suscetíveis à inibição do metabolismo energético aeróbico. Assim, especular que a toxicidade da AgN possa ser devido à inibição da cadeia respiratória mitocondrial como também sugerimos que a AgN inibiu a atividade da CK por meio da interação com grupos tiol da enzima.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; cadeia respiratória mitocondrial; creatina quinase; cérebro, músculo esquelético, coração, fígado.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgN) are well-known nanoproducts whereas silver exhibits remarkably unusual physical, chemical and biological properties. In medicine, silver has been used for years; it has known antimicrobial properties and even has been shown to prevent HIV binding to host cells. In addition, silver has been used in water and air filtration for eliminating microorganisms, and, more recently, as a biocide to prevent infection in burns, traumatic injuries and diabetic ulcers. Other uses include catheter coating and other medical devices implanted on or within the body. In contact with the human body, nanoparticles can elicit a spectrum of tissue responses such as the generation of reactive oxygen species, decreased mitochondria function and even cell death. Functioning as an effective buffering system of cellular ATP levels, the creatine kinase (CK) plays an important role in metabolism of high-energy consuming tissues such as the brain, skeletal muscle and heart. One CK activity diminution may damage energy homeostasis, contributing to cell death. Mitochondria are intracellular organelles that play an important role in ATP production. In the present work, we evaluate the *in vitro* effect of AgN on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes from the brain, skeletal muscle, heart and liver and brain, heart and skeletal muscle CK activity in rats. Our results demonstrate that AgN (10, 25 and 50 mg L⁻¹) decreases the activity of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV from all tissues while in the CK activity they were inhibited in brain and skeletal muscle, but not in heart. Tissues with large energy needs, such as the brain, skeletal muscle, heart and liver, contain large numbers of mitochondria and are highly susceptible to aerobic energy metabolism inhibition. Thus, we speculate that the AgN toxicity may be due to the mitochondrial respiratory chain inhibition as well as we suggest that the AgN inhibited CK activity through enzyme thiol group interactions.

Key-Word: silver nanoparticles; mitochondrial respiratory chain; creatine kinase; brain, skeletal muscle, heart, liver.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-SH) – Grupo sulfídrico

ADP – adenosina difosfato

AgN – Nanopartículas de prata

ATP – adenosina trifosfato

CK – creatina quinase

CK-BB – creatina quinase cérebro-específica

CK-Ci – creatina quinase citosólica

CK-MB – creatina quinase músculo cardíaco-específico

CK-MM – creatina quinase músculo esquelético-específica

CO₂ – Gás carbônico

ROS – espécies ativas de oxigênio

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo

GABA – ácido gama-aminobutírico

GTP – guanosina trifosfato

LDH – Lactato desidrogenase

Me-NPs – Nanopartículas metálicas

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

nm – nanômetro

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

SDH - succinato desidrogenase

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 - Nanopartículas de prata	14
1.1.1 - Propriedades antimicrobianas de nanocompósitos empregando Ag-NPs	15
1.1.2 - Toxicologia e nanomateriais	15
1.2 - Metabolismo Energético	17
1.2.1 – Histórico	17
1.2.2 - Destinos da Glicose e Ciclo de Krebs	17
1.2.3 - Cadeia Respiratória.....	19
1.2.4 - Creatina Quinase.....	20
1.2.5 - Implicações das Disfunções Metabólicas para as Células.....	21
2.1 - GERAL.....	23
2.2 - ESPECÍFICOS:.....	23
3 – RESULTADOS.....	24
3.1 ARTIGO 1	24
3.2 ARTIGO 2	41
4 – DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica vem se beneficiando com o uso de drogas e agentes diagnosticantes baseados em compostos inorgânicos (complexos de coordenação). Por isso, alguns grupos de pesquisa têm se dedicado à química sintética de complexos de metais de transição, visando, principalmente, avaliar e determinar o potencial terapêutico e ação biológica que estes compostos possuem (Beirith *et al*, 1999; Seifriz *et al*, 1999).

Complexos metálicos são usados comumente como medicamentos. O complexo de ouro $K[Au(CN)_2]$, por exemplo, foi introduzido na virada do século passado para o tratamento da tuberculose e logo após substituído pelos tiolatos de ouro (I), que foram usados no anos 30 para o tratamento da artrite reumatóide. Atualmente, várias formas de tiolatos de ouro (I), injetáveis ou orais, são utilizados clinicamente (Price e Sadler, 1996).

Outro exemplo é o nitroprussiato de sódio, usado, especialmente, em emergências de crise hipertensiva (vasodilatação). É um complexo metálico que carrega o ligante reativo, o óxido nítrico (NO), ao seu sítio de ação (Stochel *et al*, 1998).

Nanopartículas de prata apresentam interessantes propriedades, incluindo ação antimicrobiana. Vem sendo incorporada em matérias-primas para fabricação de bens de consumo onde o efeito oligodinâmico seja desejado. Apesar do largo espectro de aplicações na moderna tecnologia (fabricação de fibras têxteis, produtos hospitalares, indústria alimentícia e higiene pessoal), há poucas informações referentes à saúde humana e implicações ambientais. Tem-se dado muita ênfase

nas aplicações em potencial, porém sem a devida preocupação com os possíveis efeitos tóxicos destes novos materiais em sistemas biológicos.

Como materiais de dimensões nanométricas, podem atravessar membranas citoplasmáticas é fundamental estabelecer limites de segurança para sua manipulação e incorporação em matérias-primas. Além do efeito oligodinâmico, também é necessário determinar se tal material pode levar células a estresse oxidativo, interferir em processos bioquímicos vitais, interação com enzimas da cadeia respiratória, entre outros. A forma geometria e o tamanho das nanopartículas dependem do método de preparo, fazendo-se necessário estabelecer uma correlação entre a atividade biológica deste material e suas condições de preparo.

Nanotecnologia envolve a criação e a manipulação de materiais em nanoescala, para criar produtos que exibem novas propriedades. Recentemente, nanomateriais tais como nanotubos, nanofios, fulerenos e pontos quânticos, têm recebido enorme atenção por criar novos tipos de ferramentas analíticas para biotecnologia e ciências da vida. Nanomateriais, cujas dimensões estão compreendidas na faixa de 1 a 100nm, têm sido usados para criar dispositivos únicos numa escala nanométrica e apresentando novas propriedades funcionais físicas e químicas (Colvin, 2003; Oberdörster, 2004).

Uma busca na base de dados do site “www.sciencedirect.com” empregando a palavra-chave “nanoparticles” retornou mais de 57807 artigos. Mais de 6000 artigos já estão disponíveis para 2009. Contudo, quando esta busca é feita acrescentando-se a palavra-chave “toxicity”, somente 1007 artigos são localizados.

Estes números, por si só, expressam a relevância e necessidade de estudos complementares acerca deste tema.

Pesquisas em materiais antimicrobianos, contendo várias substâncias naturais e inorgânicas têm sido intensificadas, pois podem auxiliar na redução de contaminações por microrganismos como fungos, bactérias ou vírus (Kim et al, 1998; Cho et al, 2005).

Nanopartículas metálicas (Me-NPs), que possuem uma elevada área superficial específica e uma alta fração de átomos superficiais, têm sido estudadas extensivamente devido às suas características físico-químicas únicas, incluindo atividade catalítica, propriedades ópticas, propriedades eletrônicas, atividade antimicrobiana e propriedades magnéticas (Kowshik et al, 2003; Souza et al, 2004; Duran et al, 2005).

Contudo, efeitos adversos foram relatados por Hussain et al.(2005). Os autores relatam que a exposição de linhagem de células germinativas C18-4, células hepáticas BRL 3A e linhagem de células neuroendócrina PC-12 a Ag-NPs por 24 h resulta em aumento na degradação da LDH (lactato desidrogenase) dependente da concentração, sugerindo significativa citotoxicidade na faixa de concentração de 10 a 50 µg/ml. Os mesmos autores relatam estudos biológicos (bioquímicos) de outros materiais nanoparticulados na função mitocondrial e em associação a estresse oxidativo decorrente da formação de ROS. Estudos conduzidos por Schubert et al. (2006) apontam que nanopartículas de óxido de cério (CeO_2) e óxido de ítrio (Y_2O_3) podem ter propriedades antioxidantes que promovem a sobrevivência de células sob condições de estresse oxidativo. Estes resultados indicam perspectivas de aplicação terapêutica para estes nanomateriais.

Dentre os Me-NPs, nanopartículas de prata (AgN) tem mostrado efeitos inibitórios e bactericidas. Estudos recentes conduzidos em nosso grupo (Paula et al. 2005) relatam a preparação e caracterização do terpolímero, poli-[trans-

[RuCl₂(vpy)₄]-estireno-4-vinilpiridina} impregnado com nanopartículas de prata em meio aquoso. Verificou-se que o nanocompósito, obtido pela incorporação de AgN a matriz polimérica, apresenta efeito bactericida para cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em meio de cultura a base de Muller & Hinton. Um halo de inibição foi verificado em torno do polímero impregnado com AgN. O mesmo não foi observado para o polímero sem AgN.

1.1 - Nanopartículas de prata

Devido ao seu tamanho reduzido, nanopartículas de prata exibem propriedades que diferem das propriedades em escala macroscópica. Devido a essas novas propriedades têm-se intensificado estudos para a produção desses nanoparticulados.

Uma das formas de obtenção das nanopartículas de prata é por meio da redução química de nitrato de prata usando NaBH₄ como agente redutor em um sistema água em óleo de misturas reversas, usando um surfactante como agente estabilizador. O NaBH₄ é amplamente usado como agente redutor na síntese de nanopartículas de prata.

Outra forma descrita por Zhao *et al.* (2006) é preparar as nanopartículas com ácido mercaptosulfônico como estabilizador, fazendo com que fiquem carregadas negativamente em solução aquosa. Com isso, produziu-se nanopartículas esféricas estáveis, com diâmetro de aproximadamente 8nm. Essas nanopartículas foram utilizadas para a produção de filmes multicamadas com um polímero.

Mayer *et al.* (2004) investigaram um novo tipo de material nanocompósito baseado em nanopartículas de prata e complexos de rutênio.

1.1.1 - Propriedades antimicrobianas de nanocompósitos empregando AgN

A prata tem uma ação bactericida conhecida há muito tempo, sendo eficaz na destruição de mais de 650 organismos patogênicos. Acredita-se que os metais pesados liberam os íons que reagem com os grupos tióis (-SH) das proteínas da superfície. Tais proteínas projetam-se através da membrana celular bacteriana, permitindo o transporte dos nutrientes através da parede celular. Os íons monovalente de prata (Ag^+) substituem o cátion hidrogênio (H^+) ou grupos tióis, inativando a proteína e, assim, diminuindo a permeabilidade da membrana, que pode causar eventualmente a morte celular. (Clemente, Jarrett 1994; Feng *et al*, 2000).

A reação da prata monovalente com grupos -SH produz grupos (-S-Ag) muito mais estáveis na superfície bacteriana da célula. Um estudo mostra que somente na superfície da célula contendo grupos -SH foram afetados pela prata, constatando uma ausência de prata no interior da célula bacteriana (Davies e Etyris, 1997). Isto poderia explicar porque somente as bactérias e os vírus são afetados pelos íons Ag^+ ao contrário das células que fazem parte da classe dos mamíferos, não apresentarem grupos (-SH) exteriores, ou na superfície. Segundo estes estudos, os íons prata não são capazes de permear através das membranas celulares e então reagem com enzimas contendo grupos SH, tornando a toxicidade da prata relativamente baixa aos seres humanos e aos animais.

1.1.2 - Toxicologia e nanomateriais

Apesar da ampla variedade de aplicações que estão sendo desenvolvidas e investigadas para materiais com nanopartículas de prata, muito pouco é sabido a

respeito dos efeitos das nanopartículas de prata no ambiente e na saúde humana em geral.

A prata coloidal foi removida oficialmente da Farmacopéia dos Estados Unidos em 1975, quando se descobriu que o uso em longo prazo das preparações de prata levaria a uma doença conhecida como *Argyria*; uma condição que torna a pele com a coloração acinzentada, causada pelo depósito de sais de prata na epiderme e nos órgãos internos. (Fung, Bowen 1996; Wadhera, Fung 2005).

A maioria dos pesquisadores acredita que os íons e as nanopartículas de prata não causam nenhum efeito tóxico nos animais pelo fato das células animais não possuírem grupos tióis exteriores e, portanto, não há interação com a prata. Braydich-Stolle *et al.*, do Departamento de Biologia da Universidade de Dayton (Dayton, Ohio), investigaram o efeito da prata em gametócitos, ou células adultas (Braydich-Stoller *et al.*, 2005). Os resultados destes estudos indicaram que a sensibilidade das células adultas do *C18-4 germline* foi bastante sensível as nanopartículas de prata do que outras linhas celulares geralmente usadas em estudos de toxicidade (Braydich-Stoller *et al.*, 2005).

Nanopartículas de prata com 15nm de diâmetro são capazes de reduzir drasticamente a função das mitocôndrias, que são responsáveis em converter nutrientes em energia em forma de ATP. O estudo sugeriu que a prata nanoparticulada poderia ser tóxica para ossos e outros tecidos que poderiam estar em contato direto com dispositivos médicos implantados. Os autores compararam a citotoxicidade das nanopartículas de prata no *germline* da célula adulta com metais nanoparticulados, como o cádmio, o alumínio, e o molibdênio, concluindo que a prata era de maneira surpreendente mais tóxica aos gametócitos do que os outros metais, inclusive as nanopartículas do cádmio (Braydich-Stoller *et al.*, 2005).

1.2 - Metabolismo Energético

1.2.1 – Histórico

Em 1937, Hans Krebs propôs uma série de reações do metabolismo intermediário de carboidratos. Atualmente, o ciclo proposto por Krebs leva o seu nome. O ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico, é a via final comum para a oxidação das moléculas alimentares, servindo também como fonte de precursores para biossínteses (Stryer *et al*, 2004).

Há aproximadamente meio século, Kennedy e Lehninger descobriram que as mitocôndrias contêm as enzimas do ciclo de Krebs e as enzimas de oxidação dos ácidos graxos, além dos complexos respiratórios. As mitocôndrias são chamadas de “casa de força” da célula, pois é dentro destas organelas que ocorre a maior parte da captura de energia formada a partir da oxidação respiratória (Stryer *et al*, 2004). Alguns anos depois, por meio de microscopia eletrônica, descobriu-se que a mitocôndria apresenta duas membranas, uma externa e uma interna. Em 1961, Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica, sugerindo que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão acoplados a um gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna. Mitchell sugeriu que bombas de prótons criariam esse gradiente de elétrons, que seria a força motriz para a síntese de ATP.

1.2.2 - Destinos da Glicose e Ciclo de Krebs

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, como, por exemplo, o transporte ativo de íons e moléculas, síntese de macromoléculas e outras

biomoléculas a partir de precursores simples e para a contração muscular. A energia necessária para realizar essas funções é obtida com a oxidação de substâncias pela respiração celular. O ATP é o principal combustível da célula na maioria dos processos que precisam de energia. A energia é liberada pela hidrólise de ATP e serve para impulsionar uma série de reações (Nelson e Cox, 2000).

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo. A glicose é transportada para dentro das células por proteínas transportadoras específicas. Ao entrar na célula, a glicose pode ser metabolizada em diferentes rotas metabólicas. A principal via de degradação da glicose é a glicólise, uma rota que envolve uma seqüência de reações que ocorre no citosol e forma como produto final o piruvato. Uma molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato e de ATP. Além disso, a glicose pode participar do ciclo das pentoses, que tem como objetivo formar NADPH, um doador de elétrons de fundamental importância em biossínteses redutoras, e ribose-5-fosfato, precursor na biossíntese de nucleotídeos. Quando a célula está com elevados níveis de ATP, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio, que pode ser liberado e utilizado rapidamente se a célula necessitar de energia, ou formar triacilglicerol (Clark *et al*, 1993; Marks *et al*, 1996; Nelson e Cox, 2000).

Em organismos superiores, o piruvato, formado na glicólise a partir de glicose, pode seguir duas rotas metabólicas distintas. Quando há baixa quantidade de oxigênio, como no trabalho muscular forçado ou na hipóxia, o piruvato pode ser convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase, formando ATP e consumindo NADH. No entanto, só uma pequena quantidade da energia da glicose é liberada pela conversão de piruvato a lactato (Marks *et al*, 1996; Nelson e Cox, 2000).

Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase, que forma acetil coenzima A (acetil-CoA). A acetil-CoA inicia o ciclo de Krebs. É importante salientar que a acetil-CoA pode ser formada também pela oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (Clark *et al*, 1993; Marks *et al*, 1996; Nelson e Cox, 2000).

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste de uma seqüência de reações onde, em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH, uma de FADH₂, duas de CO₂ e uma de GTP. O NADH e FADH₂ produzidos no ciclo de Krebs são carreadores de elétrons e são utilizados na cadeia respiratória para a produção de ATP na fosforilação oxidativa (Marks *et al*, 1996; Nelson e Cox, 2000). Altos níveis de ATP inibem o ciclo de Krebs por mecanismos complementares em vários locais do ciclo. Um dos pontos de controle é a conversão de piruvato a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, inibida por ATP, acetil-CoA e NADH (Williamson & Cooper, 1980).

1.2.3 - Cadeia Respiratória

A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, assim como o ciclo de Krebs, ocorrem nas mitocôndrias. A cadeia respiratória é formada por uma série de complexos protéicos, onde ocorre a transferência de elétrons doados por NADH e FADH₂. A transferência de elétrons pela cadeia respiratória leva ao bombeamento de prótons da matriz para o lado citosólico da membrana mitocondrial interna. O gradiente de prótons é usado para impulsionar a síntese de ATP (Erecinska e Dagani, 1990; Heales *et al*, 1999; Wallace, 1999; Nelson e Cox, 2000).

A cadeia respiratória é composta de quatro complexos (I, II, III e IV). O complexo I, também chamado de NADH: ubiquinona oxirredutase, realiza a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que dois prótons sejam bombeados para o espaço intermembrana. O complexo II, também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase, é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e três subunidades hidrofóbicas. Esse complexo participa do ciclo de Krebs e transfere elétrons do succinato para a ubiquinona e também forma ubiquinol. O complexo III, ou citocromo c oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O complexo IV, mais conhecido como citocromo c oxidase, transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio e forma água. Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados (Wallace, 1999; Voet e Voet, 2002).

O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força-motriz para o complexo V, ou ATP sintase, formar ATP (fosforilação oxidativa). O ATP é transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, através de um sistema antiporte (Heales *et al*, 1999; Wallace, 1999; Nelson e Cox, 2000; Voet e Voet, 2002).

1.2.4 - Creatina Quinase

A creatina quinase consiste de um grupo de isoenzimas com um papel central no metabolismo energético, principalmente para tecidos com alta demanda energética, como cérebro, músculo cardíaco e esquelético, onde funciona como um

efetivo sistema de tampão para os níveis celulares de ATP. A creatina quinase catalisa a transfosforilação reversível entre ATP e creatina a ADP e fosfocreatina [$\text{MgATP}^- + \text{creatina} \leftrightarrow (\text{fosfocreatina})^- + \text{MgADP}^- + \text{H}^+$], ajudando a manter os níveis dos substratos fosforilados. Sabe-se que durante a excitação nervosa e neuromuscular ocorre um aumento de dez vezes no *turnover* celular de ATP e, que durante essas mudanças rápidas, o sistema creatina/fosfocreatina é necessário tanto como um tampão energético quanto como um sistema de transporte entre os locais de produção e consumo de ATP pelas ATPases para evitar grandes flutuações nos níveis de ATP/ADP celulares nesses tecidos excitáveis (Bessman e Carpenter, 1985; Wallimann *et al*, 1992).

As isoformas da creatina quinase estão localizadas em sítios de demanda e produção energética. A isoforma citosólica (CK-CI) consiste de dímeros e é expressa de uma maneira tecido específica, isto é, cérebro-específica (CK-BB), músculo esquelético-específica (CK-MM) e um heterodímero músculo cardíaco-específico (CK-MB) (Wallimann *et al*, 1992; Hamman *et al*, 1995; O’Gorman *et al*, 1996).

Devido à sua localização próxima a sítios onde se dá a geração de energia e transporte de íons através de membranas, o sistema CK/fosfocreatina desempenha um papel fundamental na homeostase energética neuromuscular. Assim, é presumível que alterações na função da creatina quinase levem ao desenvolvimento de vários estados patológicos envolvendo o cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco (Hamman *et al*, 1995; Aksenov *et al*, 1999).

1.2.5 - Implicações das Disfunções Metabólicas para as Células

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP (Heales *et al*, 1999). Sabe-se, também, que o dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e morte celular (Ankarcrona *et al*, 1995). A diminuição do metabolismo energético cerebral também pode levar à apoptose (Heales *et al*, 1999). A redução de produção de energia no cérebro também pode comprometer a síntese de neurotransmissores (acetilcolina, glutamato, aspartato e GABA) e lipídios nesse tecido e pode, por isso, também levar a dano neuronal (Di Donato, 2000). A redução do metabolismo energético também pode diminuir a captação de glutamato pelos astrócitos e pelos neurônios, causando acúmulo excessivo de glutamato na fenda sináptica, que pode levar à morte neuronal (Henneberry *et al*, 1989; Ludolph *et al*, 1993).

A diminuição no metabolismo energético cerebral parece estar associada com algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, isquemia cerebral e esclerose amiotrófica lateral (Brennan *et al*, 1985; Beal, 1992; Heales *et al*, 1999; Blass, 2001; Schurr, 2002). Acredita-se que a diminuição do metabolismo energético cerebral está envolvida na gênese de danos neurológicos dessas doenças (Beal, 1992). Além disso, a diminuição do metabolismo energético no cérebro parece estar envolvida com alguns Erros Inatos do Metabolismo (EIM), como a fenilcetonúria (Rech *et al*, 2002), acidemia metilmalônica (Wajner *et al*, 1992) e hiperargininemia experimental em ratos (Delwing *et al*, 2003).

Tendo em vista o amplo espectro de aplicações potenciais para materiais nanoparticulados, em especial nanoprata, neste estudo avaliou-se o efeito *in vitro* desta sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória celular e enzima CK nas seguintes estruturas: cérebro, coração e músculo esquelético e fígado de ratos.

2 - OBJETIVOS

2.1 - GERAL

-Avaliar os efeitos *in vitro* das AgN sobre a cadeia respiratória celular e creatina quinase.

2.2 - ESPECÍFICOS:

-Avaliar o efeito agudo *in vitro* de nanopartículas de prata sobre a atividade da cadeia respiratória celular em músculo esquelético, cardíaco, cérebro e fígado de ratos.

-Avaliar o efeito agudo *in vitro* de nanopartículas de prata sobre a atividade da creatina quinase em músculo esquelético, cardíaco, cérebro de ratos.

3 – RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1

***In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity**

Marcos Marques da Silva Paula^{*a}, Cláudio Sérgio da Costa^a,
Mario César Baldin^a, Giselli Scaini^b, Gislaine Tezza Rezin^b, Karen Segala^c, Vanessa
Moraes de Andrade^d, César Vitório Franco^c, Emilio Luiz Streck^b

Aceito para publicação no JBCS nº 398/08V3

***In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase
activity**

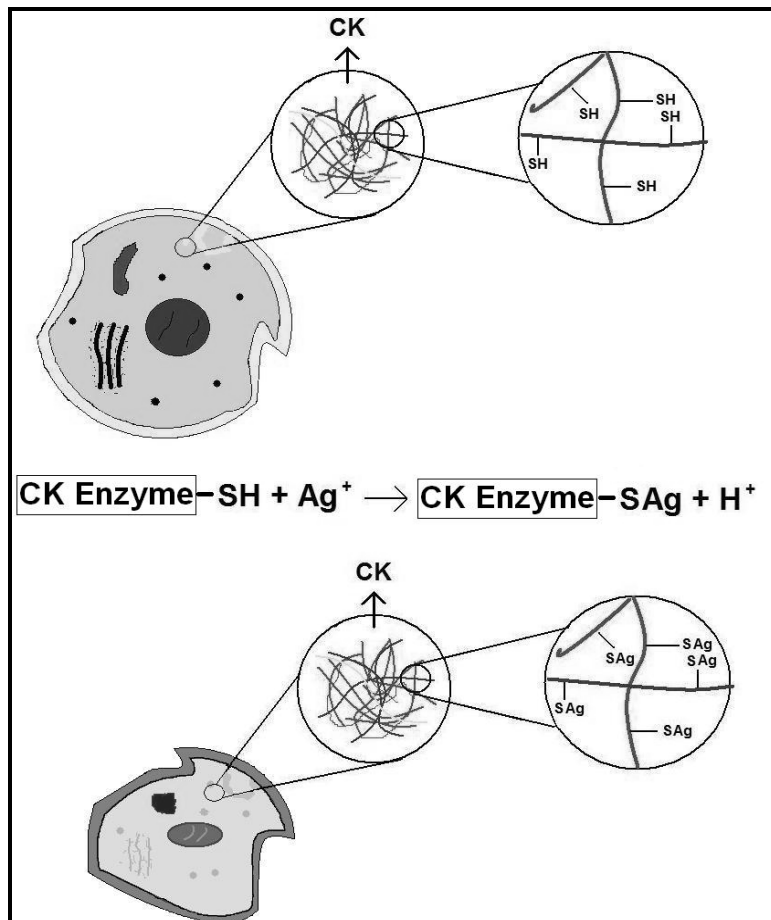
Marcos Marques da Silva Paula^{*a}, Cláudio Sérgio da Costa^a,
Mario César Baldin^a, Giselli Scaini^b, Gislaine Tezza Rezin^b, Karen
Segala^c, Vanessa Moraes de Andrade^d, César Vítório Franco^c, Emilio
Luiz Streck^b

^aLaboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; ^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; ^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil; ^dLaboratório de Imunologia e Mutagênese, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

*Correspondent author: Av. Universitária, 1105. PPG-CS – Lasicom.

e-mail address: mms@unesc.net

Graphical Abstract



***In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity**

One of the most prominent nanoproducts is the silver nanoparticle (AgN), since silver ions exhibit remarkably unusual physical, chemical and biological properties. Creatine kinase (CK) plays a central role in metabolism of high-energy consuming tissues such as brain, skeletal muscle and heart, where it functions as an effective buffering system of cellular ATP levels. A diminution of CK activity may impair energy homeostasis, contributing to cell death. In the present work we studied the *in vitro* effect of AgN on the activity of CK from rat brain, heart and skeletal muscle. Our results demonstrated that AgN (10, 25 and 50 mg L⁻¹) *in vitro* inhibited CK from brain and skeletal muscle, but not from heart. Several works showed that AgN cytotoxic effects probably involve interaction between silver ions and sulphhydryl groups of proteins. We suggest that AgN inhibited CK activity through interactions with thiol groups of the enzyme.

Keywords: silver nanoparticles, creatine kinase, brain, heart, skeletal muscle

Introduction

Medicinal inorganic chemistry is a discipline of growing significance in both therapeutic and diagnostic medicine. Inorganic compounds have been used in medicine in an empirical way with little attempt to design the compounds to be used. The design of new biologically active compounds involves the control of toxicity and the target of the metal to specific tissues, organs, or cells.¹ The current array of successful metallopharmaceuticals includes platinum anticancer drugs, radio diagnostic agents and others.² Thus, biomedical inorganic chemistry offers the potential for the design of novel therapeutic and diagnostic agents and for the treatment and understanding of diseases.³

Nanotechnology involves the creation and manipulation of materials at nanoscale levels and is a promising field for generating new applications in medicine.⁴⁻⁸ One of the most prominent nanoproducts are silver nanoparticles (AgN), since silver exhibits remarkably unusual physical, chemical and biological properties.⁹ Silver has been known in antiquity to be an antibacterial agent and was used in colloidal form in ointments in the end of the 19th century. Still, the strong antimicrobial activity is a major direction for development of AgN products,^{10,11} including contraceptive devices, surgical instruments and bone prostheses, all coated with AgN.¹²

In contact with human body, nanoparticles can undergo a series of processes like binding and reacting with proteins, phagocytosis, deposition, clearance and translocation. Moreover, nanoparticles can elicit a spectrum of tissue responses such as cell activation, generation of reactive oxygen species (ROS) and cell death.¹³⁻¹⁵ It was recently demonstrated that several cell lines exposed to AgN presented decreased function of mitochondria.^{14,16,17} However, the mechanisms underlying this

effect are not elucidated yet, but probably involve interaction between silver ions and sulphhydryl groups of proteins.

Creatine kinase (CK; E.C. 2.7.3.2) plays a central role in metabolism of high-energy consuming tissues such as brain, skeletal muscle and heart, where it functions as an effective buffering system of cellular adenosine triphosphate (ATP) levels. The enzyme catalyzes the reversible transfer of the phosphoryl group from phosphocreatine to adenosine diphosphate (ADP), regenerating ATP. It is believed that during excitation a 10-fold increase of cellular turnover occurs, and that during these rapid changes the creatine/phosphocreatine/CK system is necessary as an energy buffering system to avoid large fluctuations of cellular ATP/ADP levels in excitable tissues.¹⁸⁻²⁰ It is also known that a diminution of CK activity may potentially impair energy homeostasis, contributing to cell death.²¹⁻²⁵

In this article we evaluated the *in vitro* effect of AgN on CK activity from brain, heart and skeletal muscle of rats.

Experimental

Synthesis of silver nanoparticles (AgN) in aqueous media

AgN was synthesized through a 0.01 mol L⁻¹ equimolar solution of AgNO₃ and sodium citrate; NaBH₄ in ultra pure water was then added and the final solution was kept under vigorous stirring for 30 min. This solution acquired a yellow-gray turbid aspect after the addition of NaBH₄ and a colloidal suspension was formed.^{26,27}

Animals

Adult and male Wistar rats (250-300 g) were obtained from Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense. They were caged in group of 5 with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tissue and homogenate preparation

Brain, heart and skeletal muscle (quadriceps) were homogenized (1:10, m/v) in buffer, pH 7.4 (250 mmol L⁻¹ sucrose, 2 mmol L⁻¹ EDTA, 10 mmol L⁻¹ Trizma base, 50 IU mL⁻¹ heparin). The homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min and the supernatants were separated. AgN was suspended in buffer and added to the incubation medium to final concentrations ranging from 10 to 50 mg/L and incubated at 37°C for 1 h. The activity of CK was then measured. Protein content was determined by the method described by Lowry and colleagues (1951)²⁸ using bovine serum albumin as standard.

Creatine kinase (CK) activity assay

CK activity was measured in brain homogenates pre-treated with 0.625 mmol L⁻¹ lauryl maltoside. The reaction mixture consisted of 60 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, containing 7 mmol L⁻¹ phosphocreatine, 9 mmol L⁻¹ MgSO₄ and approximately 0.4–1.2 µg protein in a final volume of 100 µL. After 15 min of pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol of ADP plus 0.08 µmol of reduced glutathione. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 µmol of *p*-hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the

colorimetric method of Hughes (1962).²⁹ The color was developed by the addition of 100 μ L 2% α -naphthol and 100 μ L 0.05% diacetyl in a final volume of 1 mL and read spectrophotometrically after 20 min at 540 nm. Results were expressed as units/min x mg protein.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Tukey test when F was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

The UV-visible absorption spectrum of AgN in aqueous medium is displayed in Figure 1. A strong absorption peak at approximately 388 nm originates from the surface plasmon resonance absorption of AgN particles. The good symmetric absorption peak implies that the size distribution of the nanoparticles is narrow. The absorption spectrum of an aqueous solution of the nanoparticles can be visualized on Figure 1, which reveals a single band with maximum absorption at 388 nm that corresponds to the surface plasmon resonance band of spherical silver particles.^{30,31}

Transmission electron microscopy (TEM) image of colloidal AgN revealed the presence of nearly spherical particles with diameters ranging from 5 to 45 nm and corroborates with data shown on recent publication (Figure 2).³² From the analysis of TEM micrographs it was selected the diameter of 600 randomly selected particles in

enlarged TEM images with resulted in the particle size distribution histogram shown in Figure 2. The size distribution was found to be well described by a lognormal distribution function from which we obtained the media particles diameter of 19.7 nm and the distribution width of 0.48. A log normal distribution is widely used for describing the polydispersity of very small particles, where the lower metallic particle size is usually more difficult to measure and shows some aggregation and corroborates with data show on recent publication.³²

Figure 3 shows the *in vitro* effect of AgN on CK activity. As seen in Figure 3A, brain CK was significantly inhibited (35-40%) by 10, 25 and 50 mg L⁻¹ AgN. Figure 3B shows that skeletal muscle CK activity was also inhibited (35-55%) by 10, 25 and 50 mg L⁻¹ AgN. On the other hand, heart CK activity was not affected (Figure 3C).

Discussion

CK is important for normal energy homeostasis by exerting several integrated functions, such as temporary energy buffering, metabolic capacity, energy transfer and metabolic control. The brain, heart and skeletal muscle are tissues with high and variable rates of ATP metabolism, have high phosphocreatine levels and CK activity.¹⁸⁻²⁰ In the present work we demonstrated that CK from brain and skeletal muscle, but not from heart, was inhibited *in vitro* by AgN (10, 25 and 50 mg L⁻¹).

The CK molecule presents many cysteine residues in its structure.¹⁸⁻²⁰ Sulphydryl groups of the enzyme can be a target for oxidation by nitric oxide and other free radicals leading to CK activity inhibition.³³ Almofti and colleagues (2003)³⁴ suggest that AgN seems to perturb mitochondria through interactions with thiol

groups of the mitochondrial inner membrane. Several works also showed that AgN exert their antimicrobial effects through the interaction with proteins thiol groups.³⁵⁻³⁷ These works suggest that AgN may interact with proteins and enzymes with thiol groups within mammalian cells.³⁸ Taking together these evidences and our present findings, it is tempting to speculate that AgN inhibited CK activity through interactions with thiol groups of the enzyme. The reason for specific inhibitory effect on brain and skeletal muscle CK are still not known. Most intriguing is the fact of that the structure of CK in brain, skeletal muscle and heart is very similar (number of thiol groups).²⁰

Our present findings are in accordance to other studies, which demonstrated impairment of metabolism caused by AgN.^{39,40} Mitochondria seem to be sensitive target of toxic effects of AgN. Besides metabolism impairment, it has been suggested that oxidative stress might also mediate the cytotoxicity of AgN.^{39,40} AgN may deplete antioxidant defense mechanism, which leads to oxidative stress. Damage to cell membranes appears to be another part of AgN mechanism of cytotoxicity that precedes mitochondrial perturbation,³⁸ since thiol-group containing proteins are abundant in the cell membrane. Evidence from the literature suggests that nanoparticles do not possess unique toxicity mechanisms.

Some studies have demonstrated the role of CK in normal muscle and brain function, tissues that are more susceptible to reduction of energy metabolism. We have recently showed that CK is inhibited in animal models of neuropsychiatry disorders, such as bipolar disorder⁴¹ and after electroconvulsive shock.⁴² Moreover, it has been widely shown that a decrease in CK activity is associated with a neurodegenerative pathway that results in neuronal loss.²¹⁻²⁵ In skeletal muscle, CK is essential to maintain a high concentration of ATP, adequate to maintain ionic gradients and perform the cellular mechanical work.⁴³ Inhibition of CK activity in

skeletal muscle has been shown to lead to significant contractile abnormalities, as well as alterations in muscle cell size, tubular aggregates of sarcoplasmic reticulum membranes, mitochondrial volume and size and also of glycolytic capacity.^{44,45}

Conclusions

In this work, we demonstrated that AgN inhibited brain and skeletal muscle CK *in vitro*. On the other hand, heart CK was not affected *in vitro* by AgN. Further studies are important to evaluate whether other enzymes involved in metabolism are also affected by AgN. Moreover, the *in vivo* effect of AgN on energy metabolism is also being evaluated.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

References

1. Ronconi, L.; Sadler, P. J.; *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 1633, 251.
2. Clarke, M. J.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 69, 232.
3. Thompson, K. H.; Orvig, C.; Kraatz, H. B.; Metzler-Nolte, N.; *Weinheim: Wiley-VCH*, **2006**.
4. Bosettia, M.; Maseeb, A.; Tobinc, E.; Cannasa M.; *Biomaterials* **2000**, 887, 23.
5. Soto, K. F.; Carrasco, A.; Powell, T. G.; Murr, L. E.; Garza, K. M.; *Mater. Sci. Eng. A.* **2006**, 1421, 26.
6. Yoshimaru, T.; Suzuki, Y.; Inoue, T.; Niide, O.; Ra, C.; *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 1949, 40.
7. Frank, X.; Karnik, R.; Wang, A. Z.; Alexis, F.; Levy-Nissenbaum, E.; Hong, S.; Langer, R. S.; Farokhzad O. C. *Nanotoday* **2007**, 14, 2.
8. Shahverdi, A. R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H. R.; Minaian, S.; *Nanomed.* 2007, 168, 3.
9. Lee, K. S.; El-Sayed, M. A.; *J. Phys. Chem.* **2006**, 19220, 110.
10. Lei, J.; *CN Patent 1806886*, **2006**.
11. Park, J. W.; *KR Patent 2006055256*, **2006**.
12. Muangman, P.; Chuntrasakul, C.; Silthram, S.; Suvanchote, S.; Benjathanung, R.; Kittidacha, S.; Rueksomtawin, S. J.; *Med. Assoc. Thai.* **2006**, 953, 89.
13. Chen, H. W.; Su, S. F.; Chien, C. T.; Lin, W. H.; Yu, S. L.; Chou, C. C.; Chen, J. J.; Yang, P. C.; *FASEB J.* **2006**, 2393, 20.
14. Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J.; *Toxicol. In Vitro* **2005**, 975, 19.

15. Yacobi, N. R.; Phuleria, H. C.; Demaio, L.; Liang, C. H.; Peng, C.; Sioutas, C.; Borok, Z.; Kim, K.; Crandall, E. D.; *Toxicol. In Vitro* **2007**, *1373*, 21.
16. Braydich-Stolle, L.; Hussain, S.; Schlager, J. J.; Hofmann, M. C.; *Toxicol. Sci.* **2005**, *412*, 88.
17. Hussain, S. M.; Javorina, A. K.; Schrand, A. M.; Duhart, H. M.; Ali, S. F.; Schlager, J. J.; *Toxicol. Sci.* **2006**, *456*, 92.
18. Bessman, S. P.; Carpenter, C. L.; *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *831*, 54.
19. Schnyder, T.; Gross, H.; Winkler, H.; Eppenberger, H. M.; Wallimann, T.; *J. Biol. Chem.* **1991**, *5318*, 266.
20. Wallimann, T.; Wyss, M.; Brdiczka, D.; Nicolay, K.; Eppenberger, H. M.; *Biochem. J.* **1992**, *21*, 281.
21. Tomimoto, H.; Yamamoto, K.; Homburger, H. A.; Yanagihara, T.; *Acta Neuropathol.* **1993**, *447*, 86.
22. Hamman, B. L.; Bittl, J. A.; Jacobus, W. E.; Allen, P. D.; Spencer, R. S.; Tian, R.; Ingwall, J. S.; *Am. J. Physiol.* **1995**, *1030*, 269.
23. Gross, W. L.; Bak, M. I.; Ingwall, J. S.; Arstall, M. A.; Smith, T. W.; Balligand, J. L.; Kelly, R. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *5693*, 93.
24. David, S.; Shoemaker, M.; Haley, B. E.; *Mol. Brain Res.* **1998**, *276*, 54.
25. Aksenov, M.; Aksenov, M.; Butterfield, D. A.; Markesbery, W. R.; *J. Neurochem.* **2000**, *2520*, 74.
26. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J.; *Chem. Commun.* **2001**, *617*, 7.
27. Murphy, C. J.; Jana, N. R.; *Adv. Mater.* **2002**, *80*, 14.
28. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* **1951**, *265*, 193.
29. Hughes, B. P.; *Clin. Chim. Acta* **1962**, *597*, 7.

30. Sun, Y.; Gates, B.; Mayers, B.; Xia, Y.; *Nano. Lett.* **2002**, *165*, 2.
31. Jiang, L. P.; Xu, S.; Zhu, J. M.; Zhang, J. R.; Zhu, J. J.; Chen, H. Y.; *Inorg. Chem.* **2004**, *5877*, 43.
32. Segala, K.; Dutra, R. L.; Oliveira, E. N.; Rossi, L. M.; Matos, J. R.; Paula, M. M. S.; Franco, C. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *1679*, 17.
33. Wolosker, H.; Panizzutti, R.; Englender, S.; *FEBS Lett.* **1996**, *274*, 392.
34. Almofti, M. R.; Ichikawa, T.; Yamashita, K.; Terada, H.; Shinohara, Y.; *J. Biochem.* **2003**, *43*, 134.
35. André, N.; *Science* **2005**, *804*, 6.
36. Elechiguerra, J. L.; Burt, J. L.; Morones, J. R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H. H.; Yacaman, M. J.; *J. Nanobiotechnol.* **2005**, *6*, 3.
37. Jose, R. M.; Jose, L. E.; Alejandra, C.; Katherine, H.; Juan, B. K.; Jose, T. R.; Miguel, J. Y.; *Nanotechnology* **2005**, *2346*, 16.
38. Chen, X.; Schluesener, H. J.; *Toxicol. Lett.* **2008**, *1*, 176.
39. Chappell, J. B.; Greviller, G. D.; *Nature* **1954**, *930*, 174.
40. Kone, B. C.; Kaleta, M.; Gullans, S. R.; *J. Membr. Biol.* **1988**, *11*, 102.
41. Streck, E. L.; Amboni, G.; Scaini, G.; Di-Pietro, P. B.; Rezin, G. T.; Valvassori, S. S.; Luz, G.; Kapczinski, F.; Quevedo, J.; *Life Sci.* **2008**, *424*, 82.
42. Burigo, M.; Roza, C. A.; Bassani, C.; Feier, G.; Dal-Pizzol, F.; Quevedo, J.; Streck, E. L.; *Neurochem. Res.* **2006**, *877*, 31.
43. Kammermeier, H.; *Basic Res. Cardiol.* **1987**, *31*, 82.
44. Shoubridge, E. A.; Radda, G. K.; *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *79*, 805.
45. Van-Deursen, J.; Heerschap, A.; Oerlemans, F.; Ruitenbeek, W.; Jap, P.; Ter-Laak, H.; Wiering, B.; *Cell* **1993**, *621*, 74.

Figure captions

Figure 1. UV-visible spectrum of silver nanoparticles (AgN) in aqueous medium.

Figure 2. Transmission electron microscopy (TEM) image of silver nanoparticles (AgN) synthesized in aqueous media.

Figure 3. *In vitro* effect of silver nanoparticles (AgN) on creatine kinase (CK) activity in brain (A), skeletal muscle (B) and heart (C) of rats. Values are expressed as mean \pm S.D., for five independent experiments performed in duplicate.

Different from control; * $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey).

Fig. 1

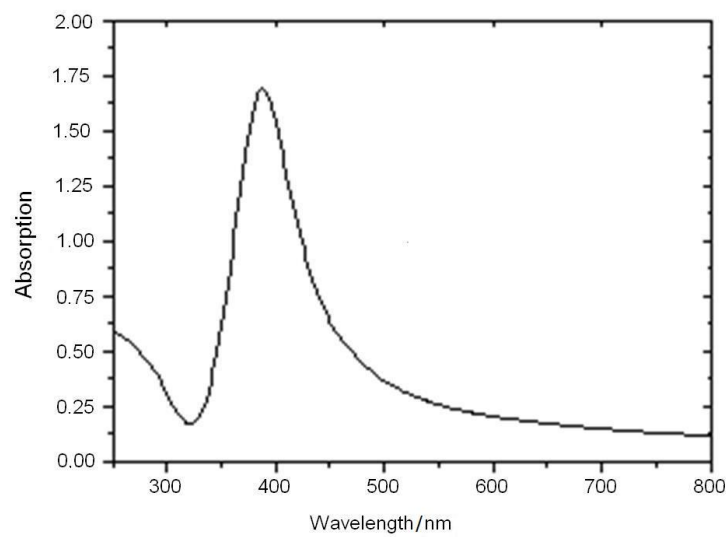


Fig. 2

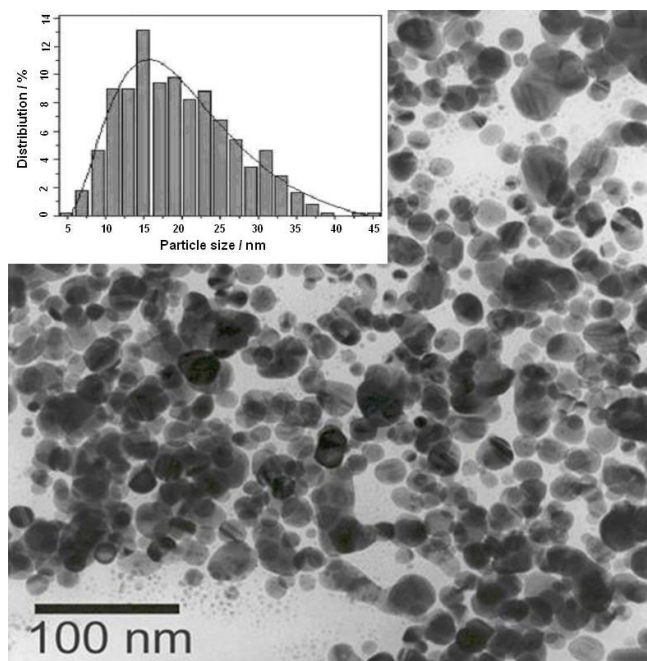
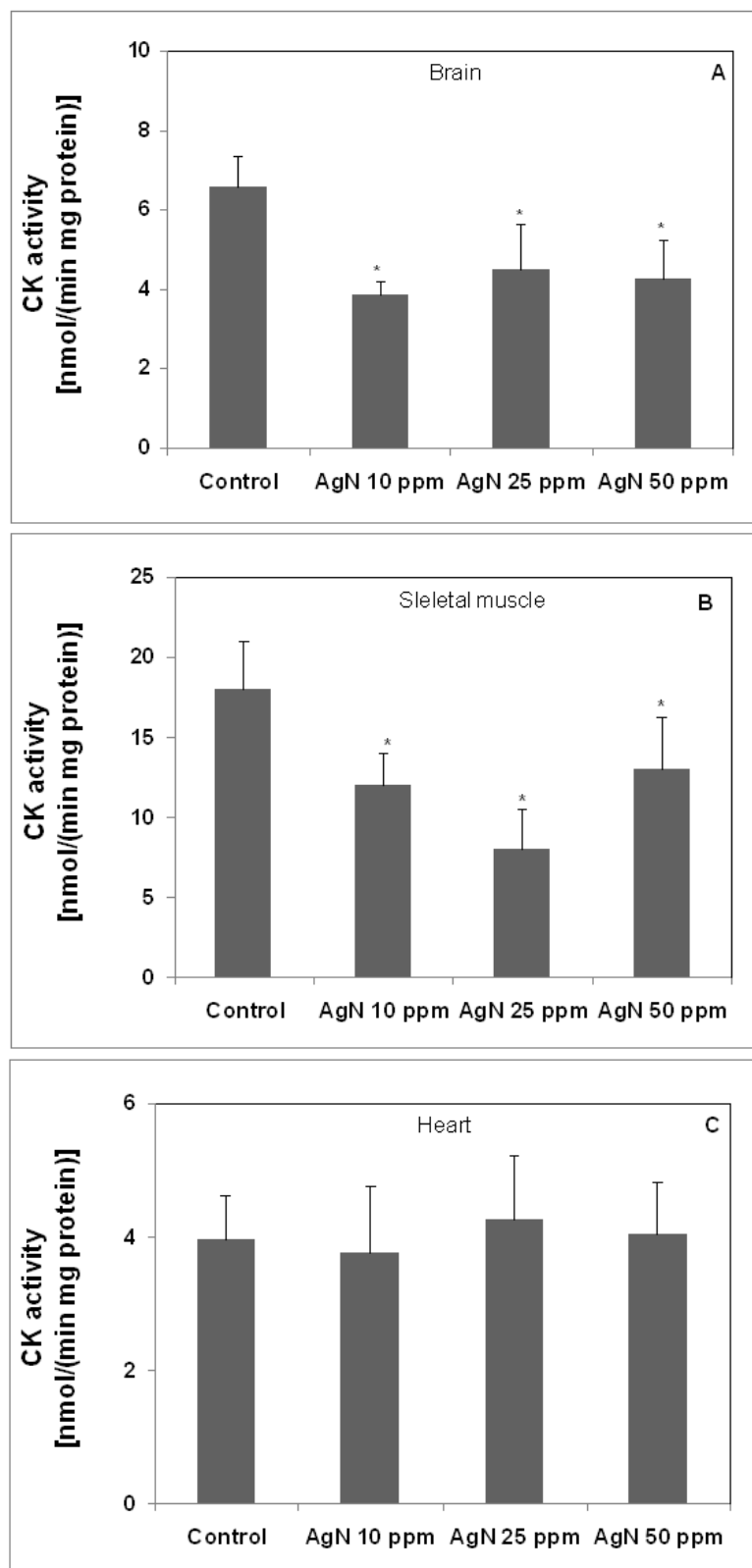


Fig. 3



3.2 ARTIGO 2

***In vitro* effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain**

Cláudio S. Costa^a, Mário C. Baldin^a, Leonardo W. Oenning^a,
Juliana F. Daufenbach^b, Cinara L. Gonçalves^b, Gislaine T. Rezin^b,
Vanessa M. Andrade^c, Emilio L. Streck^{b*}, Marcos M. S. Paula^a

Submetido a Chemico-biological interactions

***In vitro* effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain**

Cláudio S. Costa^a, Mário C. Baldin^a, Leonardo W. Oenning^a,
Juliana F. Daufenbach^b, Cinara L. Gonçalves^b, Gislaine T. Rezin^b,
Vanessa M. Andrade^c, Emilio L. Streck^{b*}, Marcos M. S. Paula^a

^aLaboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; ^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; ^cLaboratório de Imunologia e Mutagênese, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

*Correspondence: Prof. Emilio L. Streck, Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Fax: +55 48 3341 2644. E-mail: emiliostreck@gmail.com

Abstract

Silver nanoparticles (AgN) are prominent nanoproducts because silver exhibits remarkably unusual physical, chemical and biological properties. Silver has been used for years in medicine; it has known antimicrobial properties and even has been shown to prevent HIV binding to host cells. Additionally, silver has been used in water and air filtration to eliminate microorganisms, and, more recently, as a biocide to prevent infection in burns, traumatic wounds and diabetic ulcers. Other uses include coating of catheters and other medical devices implanted on or within the body. In contact with the human body, nanoparticles can elicit a spectrum of tissue responses such as the generation of reactive oxygen species, decreased function of mitochondria and even cell death. Mitochondria are intracellular organelles that play a crucial role in ATP production. In the present work, we evaluate the *in vitro* effect of AgN on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes from the brain, skeletal muscle, heart and liver of rats. Our results demonstrate that AgN (10, 25 and 50 mg L⁻¹) decreases the activity of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV from all tissues. Tissues with large energy needs, such as the brain, skeletal muscle, heart and liver, contain large numbers of mitochondria and are highly susceptible to inhibition of the aerobic energy metabolism. Thus, we speculate that the toxicity of AgN may be due to inhibition of the mitochondrial respiratory chain.

Keywords: silver nanoparticles; mitochondrial respiratory chain; brain; skeletal muscle; heart; liver.

1.Introduction

Over the past few decades, inorganic nanoparticles, whose structures exhibit significantly novel and distinct physical, chemical, and biological properties, have elicited much interest because of their potential for biological and pharmaceutical applications [1-5]. One example of these, silver nanoparticles (AgN) [6] are generally smaller than 100 nm and contain 20-15,000 silver atoms [7].

Silver has been used for years in medicine; it has known antimicrobial properties and even has been shown to prevent HIV binding to host cells [8-10]. The resurgence in the use of silver-based antiseptic materials may be linked to silver's broad-spectrum activity and far lower propensity to induce microbial resistance than antibiotics [11]. Additionally, silver has been used in water and air filtration to eliminate microorganisms, and, more recently, as a biocide to prevent infection in burns, traumatic wounds and diabetic ulcers [12,13]. Other uses include coating of catheters and other medical devices implanted on or within the body [14].

In contact with the human body, nanoparticles can elicit a spectrum of tissue responses ranging from cell activation or generation of reactive oxygen species (ROS) to cell death [15-17]. It was recently demonstrated that exposure of several cell lineages to AgN causes decreased function of the mitochondria [15,18,19], which are intracellular organelles that play a crucial role in adenosine triphosphate (ATP) production [20]. Most cellular energy is obtained through oxidative phosphorylation, a process requiring the action of a set of respiratory enzyme complexes located in a special structure of the inner mitochondrial membrane called the mitochondrial respiratory chain [21]. Several studies have demonstrated that abnormalities in energy metabolism lead to cellular degeneration [20]. We have also recently demonstrated that AgN *in vitro* inhibits creatine kinase, an enzyme that plays a

central role in the metabolism of high-energy-consuming tissues such as brain, skeletal muscle and heart, where it buffers cellular ATP levels [22-26].

Thus, based on the hypothesis that exposure of cells to AgN may impair metabolism, we evaluated the *in vitro* effect of AgN on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes from brain, skeletal muscle, heart and liver tissues of rats.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of AgN in aqueous media: AgN was synthesized by adding NaBH_4 in ultra pure water to a 0.01 mol L^{-1} equimolar solution of AgNO_3 and sodium citrate and stirring vigorously for 30 min. The solution acquired a yellow-gray turbid aspect and a colloidal suspension was formed [27,28].

2.2. Animals: Adult male Wistar rats (250-300 g) were obtained from the Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense. They were caged in groups of five with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3. Tissue and homogenate preparation: Brain, skeletal muscle (quadriceps), heart and liver were homogenized (1:10, m/v) in buffer, pH 7.4 (250 mmol L^{-1} sucrose, 2 mmol L^{-1} EDTA, 10 mmol L^{-1} Trizma base, 50 IU mL^{-1} heparin). The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min and the supernatants were removed. AgN particles were suspended in buffer, added to the supernatants to final concentrations ranging from 10 to 50 mg/L, and incubated at 37°C for 1 h. The activities of mitochondrial respiratory chain complexes (complexes I, II, III and IV)

were then measured. Protein content was determined by the method described by Lowry and colleagues [29] using bovine serum albumin as the standard.

2.4. Activities of mitochondrial respiratory chain enzymes: The samples were frozen and thawed in hypotonic assay buffer three times to fully expose the enzymes to substrates and achieve maximal activities. NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated according to the method described by Cassina and Radi [30] by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm. The activities of succinate:DCIP oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome c oxidoreductase (complex III) were determined according to the methods of Fischer and colleagues [31]. Complex II activity was measured by following the decrease in absorbance at 600 nm due to the reduction of 2,6-DCIP. Complex III activity was measured by cytochrome c reduction by succinate. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin and colleagues [32], measured by following the decrease in absorbance at 550 nm due to the oxidation of previously-reduced cytochrome c. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min.mg protein.

2.5. Statistical analysis: Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Tukey test when F was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

In agreement with a previous report [26], the UV-visible absorption spectrum of AgN in aqueous medium showed a strong, symmetric peak at approximately 388 nm originating from surface plasmon resonance, which implied that the size distribution of the nanoparticles was narrow. A transmission electron microscopy image of colloidal AgN revealed the presence of nearly spherical particles with diameters ranging from 5 to 45 nm (results not shown).

The present work shows the *in vitro* effects of AgN on the activities of mitochondrial respiratory chain enzymes in the brain, skeletal muscle, heart and liver tissues of rats. We verified that complexes I and III from brain tissue were inhibited by 10, 25 and 50 mg L⁻¹ AgN (Figure 1), and showed that complexes I, II, III and IV from liver tissue were inhibited by 10, 25 and 50 mg L⁻¹ AgN (Figure 2). This work also showed that for heart tissue, complex I was inhibited by 50 mg L⁻¹ AgN, complex II was inhibited by 25 and 50 mg L⁻¹ AgN and complexes III and IV were inhibited by 10, 25 and 50 mg L⁻¹ AgN (Figure 3). Finally, we showed that the complexes I, II, III and IV from skeletal muscle tissue were inhibited by 25 and 50 mg L⁻¹ AgN (Figure 4).

4. Discussion

In contact with the human body, nanoparticles can undergo a series of processes such as binding and reacting with proteins, phagocytosis, deposition, clearance and translocation. Moreover, nanoparticles can elicit a spectrum of tissue responses including cell activation, generation of ROS and cell death [15-17]. It was recently demonstrated that mitochondrial function decreased in several cell lines exposed to AgN [17-19].

Here we observed that AgN (10, 25 and 50 mg L⁻¹) decreased the *in vitro* activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV in the brain, skeletal muscle, heart and liver tissues of rats. The actions of these complexes within the mitochondrial respiratory chain [21] are required for oxidative phosphorylation, the major ATP-producing pathway that supplies more than 95% of the cell's total energy requirement [33-35].

Almofti and colleagues [36] suggest that AgN perturbs mitochondria through interactions with thiol groups in the mitochondrial inner membrane. It is well known that the mitochondrial respiratory chain itself is vulnerable to damage by ROS [40,41], which may act by oxidizing sulphhydryl groups of enzymes within the chain. In addition, AgN may injure cells by oxidizing the thiol groups of important cell membrane proteins, which changes membrane permeability and disrupts mitochondrial functions [37,38], as well as by depleting antioxidant defense mechanisms, which leads to oxidative stress [17,38,39]. Damage to cell membranes appears to be a part of AgN's mechanism of cytotoxicity that precedes mitochondrial perturbation [7], since thiol group-containing proteins are abundant in the cell membrane.

We recently showed that AgN also inhibits the *in vitro* activity of creatine kinase, an important enzyme that buffers cellular ATP levels [26]. This enzyme presents many cysteine residues on its structure, which may be targets for oxidation by ROS [33,34].

Our present findings are in accordance with a recent study performed by AshaRani and colleagues [42], which demonstrated that AgN decreased ATP levels and increased ROS production, probably by impairing the mitochondrial respiratory chain.

Tissues with large energy needs, such as the brain, skeletal muscle, heart and liver, contain large numbers of mitochondria and are highly susceptible to inhibition of the aerobic energy metabolism. Impairment of energy production caused by mitochondrial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of a number of diseases [43-45]. Thus, we speculate that the toxicity of AgN may be due to inhibition of the mitochondrial respiratory chain.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

5. References

- [1] P. Alivisatos, The use of nanocrystals in biological detection, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 47–52.
- [2] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1103–1169.
- [3] S. Nie, Y. Xing, G.J. Kim, J.W. Simons, Nanotechnology applications in cancer, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9 (2007) 257–288.
- [4] M.D. Wang, D.M. Shin, J.W. Simons, S. Nie, Nanotechnology for targeted cancer therapy, *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 7 (2007) 833–837.
- [5] M.C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293–346.
- [6] K.S. Lee, M.A. El-Sayed, Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of Plasmon response to size, shape, and metal composition, *J. Phys. Chem.* 110 (2006) 19220-19225.
- [7] X. Chen, H.J. Schluesener, Nanosilver: A nanoparticle in medical application, *Toxicol. Lett.* 176 (2008) 1-12.
- [8] N. Nino-Martinez, G.A. Martinez-Castanon, A. Aragon-Pina, F. Martinez-Gutierrez, J.R. Martinez-Mendoza, F. Ruiz, Characterization of silver nanoparticles synthesized on titanium dioxide fine particles, *Nanotechnology* **19** (2008) 065711/1-065711/8.
- [9] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, D. Scheddin, E. Domann, R. Schnettler, An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement, *Biomaterials* 25 (2004) 4383-4391.

- [10] H.Y. Lee, H.K. Park, Y.M. Lee, K. Kim, S.B. Park, A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications, *Chem. Commun* (2007) 2959-2961.
- [11] M.M.S. Paula, C.V. Franco, M.C. Baldin, L. Rodrigues, T. Barichello, G.D. Savi, L.F. Bellato, M.A. Fiori, L. Silva, Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C* 29 (2009) 647–650.
- [12] W.L Chou, D.G. Yu, M.C. Yang, The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment, *Polym. Adv. Technol.* 16 (2005) 600-607.
- [13] S. Silver, L.T. Phung, G. Silver, Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33 (2006) 627-634.
- [14] R. Bhattacharya, P. Mukherjee, Biological properties of “naked” metal nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1289–1306.
- [15] H.W. Chen, S.F. Su, C.T. Chien, W.H. Lin, S.L. Yu, C.C. Chou, J.J. Chen, P.C. Yang, Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.* 20 (2006) 2393-2395.
- [16] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol. In Vitro* 19 (2005) 975-983.
- [17] N.R. Yacobi, H.C. Phuleria, L. Demaio, C.H. Liang, C. Peng, C. Sioutas, Z. Borok, K. Kim, E.D. Crandall, Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties, *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 1373-1381.
- [18] L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J.J. Schlager, M.C. Hofmann, In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells, *Toxicol. Sci.* 88 (2005) 412-419.

- [19] S.M. Hussain, A.K. Javorina, A.M. Schrand, H.M. Duhart, S.F. Ali, J.J. Schlager, The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion, *Toxicol. Sci.* 92 (2006) 456-463.
- [20] V. Calabrese, G. Scapagnini, A.M. Giuffrida-Stella, T.E. Bates, J.B. Clark, Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity, *Neurochem. Res.* 26 (2001) 739–764.
- [21] D. Horn, A. Barrientos, Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase, *IUBMB life.* 60 (2008) 421-429.
- [22] R.E. Gur, S.M. Resnick, R.C. Gur, A. Alavi, S. Caroff, M. Kushner, M. Reivich, Regional brain function in schizophrenia II: repeated evaluation with positron emission tomography, *Arch. Gen. Psychiatry* 44 (1987) 126–129.
- [23] A. Rudiger, M. Singer, Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction, *Crit. Care Med.* 35 (2007) 1599–1608.
- [24] E.D. Crouser, Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome, *Mitochondrion* 4 (2004) 729–741.
- [25] C. Mancuso, G. Scapagnini, D. Curro, A.M. Giuffrida Stella, C. De Marco, D.A. Butterfield, V. Calabrese, Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders, *Front. Biosci.* 12 (2007) 1107-1123.
- [26] M.M.S. Paula, C.S. Costa, M.C. Baldin, G. Scaini, G.T. Rezin, K. Segala, V.M. Andrade, C.V. Franco, E.L. Streck, *In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity, *J. Braz. Chem. Soc.* (2009) accepted manuscript.
- [27] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio, *Chem. Commun.* 7 (2001) 617-618.

- [28] C.J. Murphy, N.R. Jana, Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires, *Adv. Mater.* 14 (2002) 80-82.
- [29] O.H. Lowry, N.G. Rosebough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [30] A. Cassina, R. Radi, Differential inhibitory Aation of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport, *Arch. Biochem. Biophys.* 328 (1996) 309-316.
- [31] J.C. Fischer, W. Ruitenbeek, J.A. Berden, J.M. Trijbels, J.H. Veerkamp, A.M. Stadhouders, R.C. Sengers, A.J. Janssen, Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle, *Clin. Chim. Acta* 153 (1985) 23-26.
- [32] P. Rustin, D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray, A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta* 228 (1994) 35-51.
- [33] S.P. Bessman, C.L. Carpenter, The creatine-creatine phosphate energy shuttle, *Annu. Rev. Biochem.* 831 (1985) 54-62.
- [34] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, H.M. Eppenberger, Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis, *Biochem. J.* 281 (1992) 21-40.
- [35] A. Rex, R. Schickert, H. Fink, Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77 (2004) 303-307.
- [36] M.R. Almofti, T. Ichikawa, K. Yamashita, H. Terada, Y. Shinohara, Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C, *J. Biochem.* 134 (2003) 43-49.

- [37] P.K. Rangachari, J. Matthews, Effect of Ag⁺ on isolated bullfrog gastric mucosa, *Amer. J. Physiol.* 248 (1985) 443–449.
- [38] B.C. Kone, M. Kaleta, S.R. Gullans, Silver ion (Ag⁺)-induced increases in cell membrane K⁺ and Na⁺ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents, *J. Membr. Biol.* 102 (1988) 11-19.
- [39] J.B. Chappell, G.D. Greviller, Effect of silver ions on mitochondrial adenosine triphosphatase, *Nature* 174 (1954) 930-931.
- [40] V. Adam-Vizi, Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005) 1140-1149.
- [41] A. Navarro, A. Boveris, The mitochondrial energy transduction system and the aging process, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292 (2007) 670-686.
- [42] P.V. AshaRani, G. Low Kah Mun, M.P. Hande, S. Valiyaveetil, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells, *ACS Nano* 3 (2009) 279-290.
- [43] S.J. Heales, J.P. Bolaños, V.C. Stewart, P.S. Brookes, J.M. Land, J.B. Clark, Nitric oxide, mitochondria and neurological disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1410 (1999) 215–228.
- [44] J.P. Blass, Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J. Neurosci. Res.* 66 (2001) 851–856.
- [45] A. Schurr, Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem. Int.* 41(2002) 1–8.

Figure legends

Figure 1. *In vitro* effects of silver nanoparticles (AgN) on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV from rat brain. Values are expressed as mean \pm S.D., for five independent experiments performed in duplicate. Different from control; * $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey).

Figure 2. *In vitro* effects of silver nanoparticles (AgN) on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV from rat liver. Values are expressed as mean \pm S.D., for five independent experiments performed in duplicate. Different from control; * $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey).

Figure 3. *In vitro* effects of silver nanoparticles (AgN) on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV from rat heart. Values are expressed as mean \pm S.D., for five independent experiments performed in duplicate. Different from control; * $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey).

Figure 4. *In vitro* effects of silver nanoparticles (AgN) on the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III and IV from rat skeletal muscle. Values are expressed as mean \pm S.D., for five independent experiments performed in duplicate. Different from control; * $p < 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey).

Fig.1

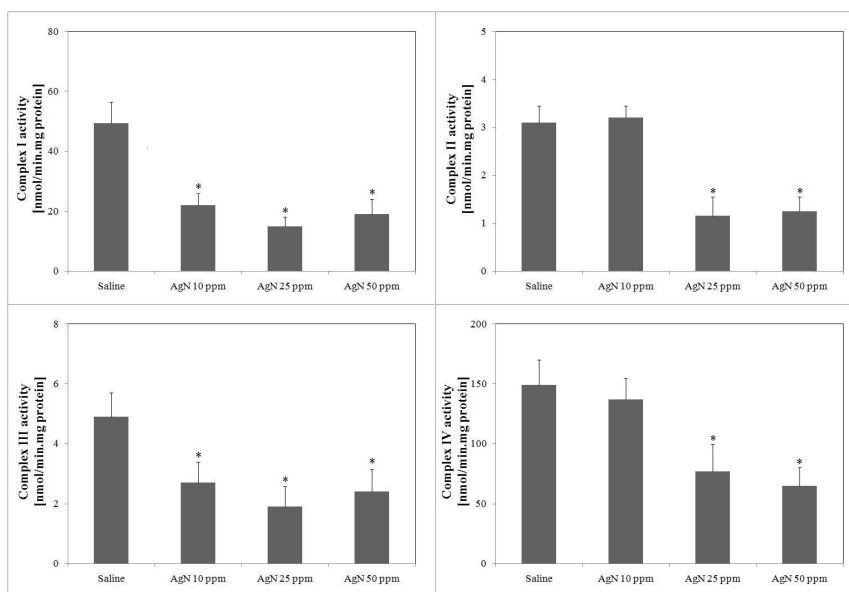


Fig. 2

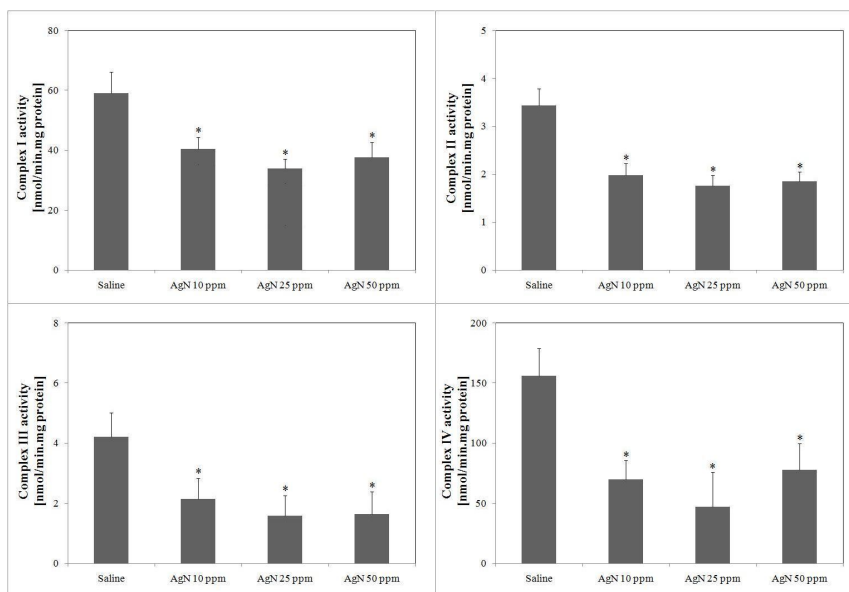


Fig.3

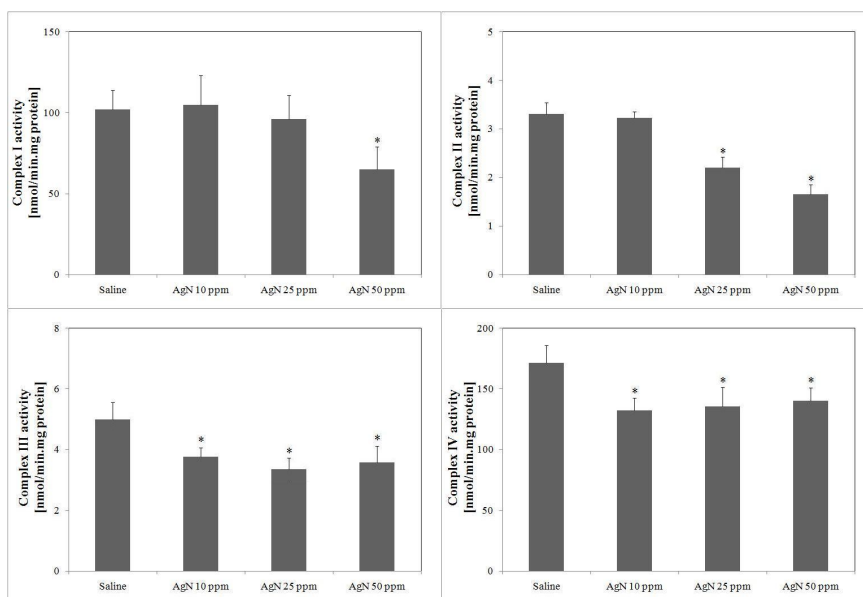
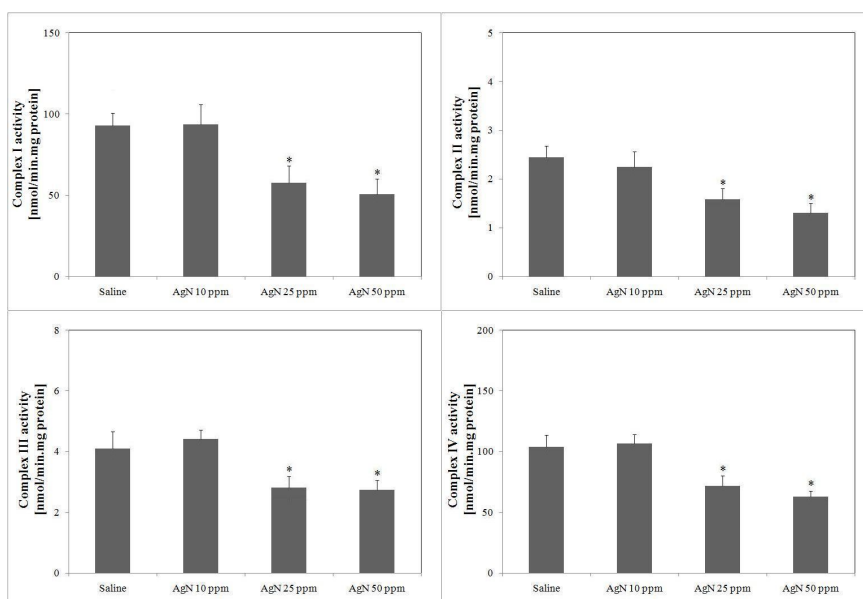


Fig.4



4 – DISCUSSÃO

A CK é importante para a homeostase energética normal na execução de diversas funções integradas, tais como o tampão energético temporário, a capacidade metabólica, a transferência energética e o controle do metabolismo. O cérebro, coração e músculo esquelético são tecidos com altas e variáveis taxas de metabolismo de ATP, tem altos níveis de fosfocreatina e atividade da CK (Bessman e Carpenter, 1985; Schnyder et al., 1991; Wallimann et al., 1992). No presente estudo, nós demonstramos que a CK do cérebro e músculo esquelético, mas não do coração, foi inibida *in vitro* pela AgN (10, 25 e 50 ppm) no cérebro e músculos esqueléticos, mas não no coração. A molécula de CK apresenta muitos resíduos de cisteína na sua estrutura (Bessman e Carpenter, 1985; Schnyder et al., 1991; Wallimann et al., 1992). Os grupos sulfidrílicos da enzima podem constituir um alvo para a oxidação por meio do óxido nítrico e outros radicais livres levando à inibição da atividade da CK (Wolosker et al., 1996). Neste contexto, Almofti e colegas (2003) sugerem que a AgN parece perturbar as mitocôndrias através de interações com grupamentos tiol do interior da membrana mitocondrial. Vários trabalhos também mostraram que a AgN exerce seus efeitos antimicrobiais através da interação com grupos tiol de proteínas (Elechiguerra et al., 2005; Jose et al., 2005). Esses estudos sugerem que a AgN pode interagir com proteínas e enzimas com grupos tiol dentro das células de mamíferos (Chen e Schluesener, 2008). Em conjunto, essas evidências e nossos achados, tentam mostrar que a AgN inibiu a atividade da CK por meio de interações com grupos tiol da enzima. A razão para o efeito inibitório específico sobre a CK do cérebro ou do músculo esquelético ainda é desconhecida. Mais fascinante é o fato de que a estrutura da CK no cérebro, músculo esquelético e coração é muito similar (número de grupos tiol) (Wallimann et al., 1992). Nossos

achados estão de acordo com outros estudos, os quais demonstraram o dano do metabolismo causado pela AgN. As mitocôndrias parecem ser alvos sensíveis de efeitos tóxicos da AgN. Além do dano metabólico, tem sido sugerido que o estresse oxidativo também possa mediar a citotoxicidade da AgN. (Chappell e Greviller, 1954; Kone et al., 1988). A AgN pode depreciar o mecanismo de defesa antioxidante, o que leva ao estresse oxidativo. O dano às membranas celulares parece ser outra parte do metabolismo do mecanismo de citotoxicidade da AgN que precede a perturbação mitocondrial (Chen e Schluesener, 2008), desde que as proteínas que contêm o grupo tiol são abundantes na membrana celular. Evidências da literatura sugerem que as nanopartículas não possuem mecanismos únicos de toxicidade. Alguns estudos têm demonstrado o papel da CK na função muscular e cerebral normal, tecidos que são mais susceptíveis à redução do metabolismo energético. Nós mostramos recentemente que a CK está inibida em modelos animais de distúrbios neuropsiquiátricos, tais como o distúrbio bipolar (Streck et al., 2008) e após o choque eletroconvulsivo (Burigo et al., 2006). Além disso, tem sido amplamente demonstrado que uma redução na atividade da CK está associada a uma via neurodegenerativa que resulta em perda neuronal (Tomimoto et al., 1993; Hamman et al., 1995; Gross et al., 1996; David et al., 1998; Aksenov et al., 2000). No músculo esquelético, a CK é essencial na manutenção de uma alta concentração de ATP, adequado para manter os gradientes iônicos e bom desempenho do trabalho mecânico celular (Kammermeier, 1987). A inibição da atividade da CK no músculo esquelético tem se mostrado, pois conduz a anormalidades contráteis significativas, como também alterações no tamanho da célula muscular, os agregados tubulares das membranas reticulares sarcoplasmáticas, volume e tamanho mitocondrial e também da capacidade glicolítica (Shoubridge e Radda,

1984;-Van Deursen et al., 1993). Nesse estudo, nós demonstramos que a AgN inibiu a CK do cérebro e músculo esquelético *in vitro*. Por outro lado, a CK do coração não foi afetada pela AgN *in vitro*. Outros estudos são necessários para avaliar se outras enzimas envolvidas também são afetadas pela AgN. Além disso, o efeito *in vivo* da AgN sobre o metabolismo energético também está sendo avaliado.

Em contato com o corpo humano, as nanopartículas podem sofrer uma série de processos tais como a ligação e reação com proteínas, fagocitose, deposição, *clearance* e translocação. Além disso, as nanopartículas podem precipitar um espectro de respostas tissulares incluindo a ativação celular, geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) e morte celular (Chen et al., 2006; Yacobi et al., 2007). Tem sido demonstrado recentemente que a função mitocondrial se reduziu em várias linhagens celulares expostas à AgN (Yacobi et al., 2007; Hussain et al., 2006). Observamos neste estudo que a AgN (10, 25 e 50 mg L⁻¹) reduziu as atividades *in vitro* dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial nos tecidos do cérebro, músculo esquelético e fígado de ratos. As ações desses complexos dentro da cadeia respiratória mitocondrial (Horn et al., 2008), são necessárias para a fosforilação celular, a principal via de produção do ATP que fornece mais de 95% da energia celular total necessária (Bessman e Carpenter, 1985; Rex et al., 2004). Almofti e colegas sugerem que a AgN perturbe as mitocôndrias através de interações com grupos tiol na membrana mitocondrial interna. É bem conhecido que a cadeia respiratória mitocondrial por si só é vulnerável ao dano pelas ROS (Adam-Vizi, 2005; Navarro e Boveris, 2007), que podem agir por meio de grupos oxidantes sulfidril de enzimas dentro da cadeia. Além disso, a AgN pode provocar lesão celular através da oxidação dos grupos tiol de proteínas importantes da membrana celular, o que modifica a permeabilidade da

membrana e perturba as funções mitocondriais, (Rangachari e Matthews, 1985; Kone et al., 1988), como também pela depleção dos mecanismos antioxidantes de defesa, o que leva ao estresse oxidativo (Yacobi et al., 2007; Kone et al., 1988; Chappell e Greviller, 1954). O dano às membranas celulares parece fazer parte do mecanismo de citotoxicidade da AgN que precede a perturbação mitocondrial (Chen e Schluesener, 2008), desde que as proteínas que contenham o grupo tiol sejam abundantes na membrana celular. Nós mostramos recentemente que a AgN também inibe a atividade *in vitro* da creatina quinase, uma importante enzima que fornece um tampão nos níveis de ATP celular (Paula et al., 2009). Essa enzima apresenta vários resíduos de cisteína em sua estrutura, o que constitui alvos para a oxidação através das ROS (Bessman e Carpenter, 1985; Wallimann et al., 1992).

Nossos achados estão de acordo com um recente estudo desenvolvido por AshaRani e colegas, 2009, os quais demonstraram que a AgN reduz os níveis de ATP e eleva a produção de ROS, provavelmente danificando a cadeia respiratória mitocondrial.

Os tecidos que necessitam de grandes quantidades de energia, tais como o cérebro, músculo esquelético, coração e fígado, contêm grande quantidade de mitocôndrias e são altamente susceptíveis à inibição do metabolismo energético aeróbico. O dano da produção energética causado pela disfunção mitocondrial tem sido implicado na patogênese de várias doenças (Heales et al., 1999; Schurr, 2002). Assim, nós suspeitamos que a toxicidade da AgN pudesse ser devida à inibição da cadeia respiratória mitocondrial.

Estudos *in vivo* estão em andamento, visando verificar se estes efeitos também ocorrem após a administração crônica destas AGN.

REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources, **Antioxidants & Redox Signaling** 7: 1140-1149. 2005.
- AKSENOV MY; AKSENOVA MV; PAYNE RM; TROJANOVSKI JQ; SCHMIDT KL; CARNEY JM; BUTTERFIELD DA; MARKESBERY WR. Oxidation of cytosolic proteins and expression of creatine kinase BB in frontal lobes of Neurodegenerative disorders. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders** 10: 158-165. 1999.
- AKSENOV MY; AKSENOVA MV; BUTTERFIELD DA; MARKESBERY WR. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **Journal of Neurochemistry** 74: 2520. 2000.
- ALMOFTI MR; ICHIKAWA T; YAMASHITA K; TERADA H; SHINOHARA Y. Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C. **Journal of Neurochemistry** 43: 134. 2003.
- ANKARCRONA M; DYPBUKT JM; BONFOCO E; ZHIVOTOVSKY B; ORRENIUS S; LIPTON AS; NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron** 15: 961-973.1995.

ASHARANI PV; MUN GLK; HANDE MP; VALIYAVEETIL S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano** 3: 279-290. 2009.

BEAL MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? **Annals of Neurology** 31: 119-130. 1992.

BEIRITH A; CRECZYNSKI-PASA TB; BONETTI VR; KONZEN M; SEIFRIZ I; PAULA MMS; FRANCO CV; CALIXTO JB. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **European Journal of Pharmacology** 369: 289-297, 1999.

BESSMAN SP; CARPENTER CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. **Annual Review of Biochemistry** 54: 831-862. 1985.

BLASS JP. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia. **Journal of Neuroscience Research** 66: 851-856. 2001.

BRAYDICH-STOLLE L; HUSSAIN S; SCHLAGER JJ; HOFMANN MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. **Toxicological Sciences** 88: 412-419, 2005.

BRENNAN WA; BIRD ED; APRILLE JR. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. **Journal of Neurochemistry** 44: 1948-1950. 1985.

BURIGO M; ROZA CA; BASSANI C; FEIER G; DAL-PIZZOL F; QUEVEDO J; STRECK EL. Decreased creatine kinase activity caused by electroconvulsive shock. **Neurochemical Research** 31: 877. 2006.

CARMICHAEL J; DEGRAFF WG; et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, **Cancer Research** 47: 936-942. 1987.

CHAPPELL JB; GREVILLER GD. Effect of silver ions on mitochondrial adenosine triphosphatase. **Nature** 930: 174, 1954.

CHEN HW; SU SF; CHIEN CT; LIN WH; YU SL; CHOU CC; CHEN JJ; YANG PC. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. **The FASEB Journal** 20: 2393-2395. 2006.

CHEN X.; SCHLUESENER HJ. Nanosilver: A nanoparticle in medical application **Toxicology Letters** 1: 176, 2008.

CHO KH; PARK JE; OSAKA T; PARK SG. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. **Electrochimica Acta** 51: 956-960 2005.

CLARK JB; BATES TE; CULLINGFORD T; LAND JM. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Developmental Neuroscience** 15: 174-180.1993.

CLEMENT JL; JARRETT PS. Antibacterial silver. **Metal-Based Drugs** 1: 467-482. 1994.

COLVIN V. The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. **Nature Biotechnology** 21: 1166-1170. 2003.

DAVID S; SHOEMAKER M; HALEY BE. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. **Molecular Brain Research** 54: 276. 1998.

DAVIES RL; ETRIS SF. The development and functions of silver in water purification and disease control. **Catalysis Today** 36: 107-114. 1997.

DELWING D; TAGLIARI B; STRECK EL; WANNMACHER CMD; WAJNER M; WYSE ATS. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. **Brain Research** 983: 58-63. 2003.

DI DONATO S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 23: 247-263. 2000.

DURAN N; MARCATO PD; ALVES OL; SOUZA G. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanotechnology** 3: 8. 2005.

ELECHIGUERRA JL; BURT JL; MORONES JR; CAMACHO-BRAGADO A; GAO X; LARA HH; YACAMAN MJ. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology** 6: 3. 2005.

ERECINSKA M; DAGANI F. Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. **The Journal of General Physiology** 95: 591-616. 1990.

FENG QL; WU J; CHEN GQ; CUI FZ; KIM TN; KIM JO. A mechanist study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Straphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Pathology** 52: 662-668. 2000.

FUNG MC; BOWEN DL. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology** 34: 119-126. 1996.

GROSS WL; BAK MI; INGWALL JS; ARSTALL MA; SMITH TW; BALLIGAND JL; KELLY RA. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93: 5693-5699. 1996.

HAMMAN BL; BITTL JA; JACOBUS WE; ALLEN PD; SPENCER RS; TIAN R; INGWALL JS. Inhibition of creatine kinase reaction decrease the contractile reserve of isolated rat hearts, **The American Journal of Physiology** 269: 1030–1036. 1995.

HEALES SJ; BOLAÑOS JP; STEWART VC; BROOKES PS; LAND JM; CLARK JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta** 1410: 215-228. 1999.

HENNEBERRY RC; NOVELLI A; COX JA; LYSKO PG. Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons: a hypothesis for cell death in aging and disease. **Annals the New York Academic of Science** 568: 225-233. 1989.

HORN D; BARRIENTOS A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase, **IUBMB life** 60: 421-429. 2008.

HUSSAIN SM; HESS KL; GEARHART JM; GEISS KT; SCHLARGER JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, **Toxicology in vitro** 7: 975-983. 2005.

HUSSAIN SM; JAVORINA AK; SCHRAND AM; DUHART HM; ALI SF; SCHLAGER JJ. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion, **Toxicological Science** 92: 456-463. 2006.

JANA NR; GEARHEART L; MURPHY CJ. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. **Chemical Communications** 7: 617-618. 2001.

JOSE RM; JOSE LE; ALEJANDRA C; KATHERINE H; JUAN BK; JOSE TR; MIGUEL JY. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology** 16: 2346-2353. 2005.

KAMMERMEIER H. High energy phosphate of the myocardium: concentration versus free energy change. **Basic Research Cardiology** 82: 31-36. 1987.

KIM TN; FENG QL; KIM JO; WU J; WANG H; CHEN GC. Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. **Journal of materials science. Materials in medicine** 3: 129-134. 1998.

KONE BC; KALETA M; GULLANS SR. Silver ion (Ag⁺)-induced increases in cell membrane K⁺ and Na⁺ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents. **The Journal of membrane biology** 102: 11-19. 1988.

KOWSHIK M; ASHTAPUTRE S; KHARRAZI S. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY₃. **Nanotechnology** 14: 95-100. 2003.

LUDOLPH AC; RIEPE M; ULLRICH K. Excitotoxicity, energy metabolism and neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 16: 716-723. 1993.

MARKS DB; MARKS AD; SMITH CM. **Basic Medical Biochemistry** Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. 1996.

MAYER CR; DUMAS E; SÉCHERES F. Size controlled formation of silver nanoparticles by direct bonding of ruthenium complexes bearing a terminal mono – or bi-pyridyl group. **Chemical Communication** 21: 345-347. 2004.

NAVARRO A; BOVERIS A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **American Journal of Physiology. Cell Physiology** 292: 670-686. 2007.

NELSON DL; COX MM. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3rd ed. New York, Worth Publishers. 2000.

O'GORMAN E; BEUTNER G; WALLIMANN T; BRDICZKA D. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta** 1276: 161-170. 1996.

OBERDÖRSTER E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives** 112.1058-1062. 2004.

PAULA MMS; GOULART G; FRANCO CV; GOMES EB. Preparação e Caracterização do Complexo Metálico Macromolecular Poli - {trans-[RuCl₂(vpy)₄]-co-Acrilato de Butila Estireno}. In: **13 SBQSul - XIII Encontro de Química da Região Sul**, 2005, Florianópolis. 13 SBQSul - XIII Encontro de Química da Região Sul, 2005.

PAULA MMS; PICH CT; PETRONILHO F; DREI LB; RUDNICKI M; OLIVEIRA MR; MOREIRA JCF; HENRIQUES JA; FRANCO CV; DAL-PIZZOL F; Antioxidant activity of new ruthenium compounds. **Redox Report** (Edinburgh) 10: 01-06. 2005.

PAULA MMS; COSTA CS; BALDIN MC; SCAINI G; REZIN GT; SEGALA K; ANDRADE VM; FRANCO CV; STRECK EL. *In vitro* effect of silver nanoparticles on creatine kinase activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society** nº 398/08V3 2009.

RANGACHARI PK; MATTHEWS J. Effect of Ag⁺ on isolated bullfrog gastric mucosa, **The American Journal of Physiology** 248: 443–449. 1985.

RECH VC; FEKSA LR; DUTRA-FILHO CS; WYSE ATS; WAJNER M; WANNMACHER CMD. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain by

phenylalanine in rat cerebral cortex. **Neurochemical research** 27: 353-357. 2002.

REX A; SCHICKERT R; FINK H. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 77: 303-307. 2004.

SCHNYDER T; GROSS H; WINKLER H; EPPENBERGER HM; WALLIMANN T; Crystallization of mitochondrial creatine kinase. Growing of large protein crystals and electron microscopic investigation of microcrystals consisting of octamers. **The Journal of Biological Chemistry** 266: 5318-5322. 1991.

SCHUBERT D; DARGUSCH R; RAITANO J; WAI S. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. **Chan Biochemical and Biophysical Research Communications** 342: 86–91. 2006.

SCHURR A. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. **Neurochemistry International** Int. 41: 1-8. 2002.

SEIFRIZ I; KONZEN M; PAULA MMS; GONÇALVES NS, SPOGANICKZ B; CRECZYNSKI-PASA TB; BONETTI VR; BEIRITH A; CALIXTO JB; FRANCO CV. Synthesis, potentiometric titration, electrochemical investigation and biological properties of *trans*-[RuCl₂(dinic)₄] (dinic = 3,5-pyridinecarboxylic acid). **Journal of Inorganic Biochemistry** 76: 153-163, 1999.

SHOUBRIDGE EA; BLAND JR; RADDA GK. Regulation of creatine kinase during steady-state isometric twitch contraction in rat skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta** 805: 72-78. 1984.

SOUZA GIH; MARCATO PD; DURAN N; ESPOSITO E. Utilization of *Fusarium oxysporum* in the biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activities. **Presented at Xth National Meeting of Environmental Microbiology**, Curitiba, PR (Brazil), [Abstract p 25]. 2004.

STRECK EL; AMBONI G; SCAINI G; DI-PIETRO PB; REZIN GT; VALVASSORI SS; LUZ G; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Brain creatine kinase activity in an animal model of mania. **Life Sciences** 82: 424-429. 2008.

STRYER L; BERG JM; TYMOCZKO JL. **Bioquímica**. 5^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1059 p. 2004.

TOMIMOTO H; YAMAMOTO K; HOMBURGER HA; YANAGIHARA T. Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. **Acta Neuropathologica** 86: 447-455. 1993.

VAN-DEURSEN J; HEERSCHAP A; OERLEMANS F; RUITENBEEK W; JAP P. TER-LAAK H; WIERING B. Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. **Cell** 74: 621-631. 1993.

VOET DONALD; VOET JUDITH G; PRATT CHARLOTTE W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 931 p. 2002.

WADHERA A; FUNG M. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. **Dermatology Online Journal** 11: 12. 2005.

WAJNER M; DUTRA JC; CARDOSO SE; WANNMACHER CMD; MOTTA ER. Effect of methylmalonate on "in vitro" lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 15: 92-96. 1992.

WALLACE DC. Mitochondrial diseases in man and mouses. **Science** 283: 1482-1487. 1999.

WALLIMANN T; WYSS M; BRDICZKA D; NICOLAY K; EPPENBERGER HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **The Biochemical Journal** 281: 21– 40. 1992.

WILLIAMSON JR; COOPER RH. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. **FEBS Letters**. 117: 73-85. 1980.

WOLOSKER H; PANIZZUTTI R; ENGLENDER S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. **FEBS Letters** 392: 274-276. 1996.

YACOBI NR; PHULERIA HC; DEMAIO L; LIANGI CH; PENG C; SIOUTAS C; BOROK Z; KIM K; CRANDALL ED. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties, **Toxicology In Vitro** 21: 1373-1381. 2007.

ZANETTE F; VICTOR EG; SCAINI G; DIPIETRO PB; CARDOSO DC; CRISTIANO MP; DAL-PIZZOL F; PAULA MMS; STRECK EL. Modulation of creatine kinase activity by ruthenium complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry** 101: 267-273. 2007.

SUANG Z; KAI Z; JING A; YINGYING S; CHANGQING S. Synthesis and layer-by-layer self-assembly of silver nanoparticles capped by mercaptosulfonic acid. **Materials Letters** 60: 1215-1218. 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)